

Lokale und systemische Veränderungen
der Aktivität saurer und neutraler
Proteasen der Ratte in der Spätphase
der Verbrennungskrankheit

Gerhard A. Weber

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0031

Aus der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. G. Heberer

Lokale und systemische Veränderungen
der Aktivität saurer und neutraler
Proteasen der Ratte in der Spätphase
der Verbrennungskrankheit

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard A. Weber
aus
Augsburg
1982



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. H. Bohmert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Heberer

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 4. Mai 1982

meiner Frau und meiner Tochter

Inhaltsangabe

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Geschichte der Proteasenforschung	1
1.2. Nomenklatur und Klassifikation	4
1.2.1. Begriffserklärung	4
1.2.2. Prinzipien der Klassifikation	6
1.2.2.1. Exopeptidasen und Endopeptidasen	6
1.2.2.2. Exopeptidasen	7
1.2.2.3. Endopeptidasen	7
1.3. Pathohistologie der Wundheilung der Haut nach Verbrennungen	8
1.4. Pathogenese der Verbrennungskrankheit	11
2. Eigene Untersuchungen	13
2.1. Saure Proteasen	13
2.2. Neutrale Proteasen	14
2.3. Methodik	15
2.3.1. Saure Proteasen	15
2.3.2. Neutrale Proteasen	16
2.4. Ergebnisse	20
2.4.1. Saure Proteasen	20
2.4.2. Neutrale Proteasen	40
2.5. Diskussion	60
3. Zusammenfassung	62
4. Literaturverzeichnis	65

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Proteasenforschung

Die Geschichte der Proteasenforschung an Zellen und Geweben kann bis zu den Ursprüngen der deutschen Laboratorien für physiologische Chemie um 1890 zurückverfolgt werden. Salkowski (1890) beschrieb chemische Veränderungen der Leber, der Muskulatur und der Nebennieren, nachdem er sie bei 37 Grad Celsius inkubiert hatte. Er vermutete bereits damals, daß diese Veränderungen auf enzymatische Aktivitäten zurückzuführen seien. Diese Beobachtung wurde in weiteren Arbeiten in Salkowski's Labor über die Produkte der Autodigestion überprüft (4).

Jacoby führte als Erster den Begriff der Autolyse ein. Er war wohl auch der Erste, der Kathepsin D hergestellt hatte, das er durch Extraktion aus autolysierter Leber gewann, indem er das Enzym durch Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällte (4).

Hedin und Rowland (Lister Institut London) beschrieben die Aktivität von sauren Proteasen der Milz (1901) (4). Sie verglichen diese Ergebnisse mit der Aktivität von Lymphknoten, der Leber, der Niere, vom Skelett- und Herzmuskel an Rindern, Hunden, Pferden und Schafen. Hedin fraktionierte 1904 Milzgewebe von Rindern um die sauren von den alkalischen Enzymen zu trennen. Er extrahierte hierbei eine saure Protease, die wir heute als Kathepsin D bezeichnen, und unterschied sie klar vom Pepsin. Der Fraktionsvorgang zur Trennung der Proteasen war dem sehr ähnlich, den siebzig Jahre später unabhängig davon Starkey und Barrett (1976) anwandten um die Elastase und das Kathepsin G aus menschlicher Milz zu gewinnen (4). Opie (1906) ermittelte die Existenz von verschiedenen Proteasen, die unter sauren oder alkalischen Bedingungen aktiv waren. Er verglich die Enzyme mit Trypsin und Pepsin, wobei die alkalische Aktivität auf die Elastase (vielleicht Kathepsin G) zurückzuführen war, die saure Aktivität auf Kathepsin D (4).

Der Begriff 'Kathepsin' wurde von Willstätter und Bamann (1929) eingeführt (4). Kathepsin wurde als eigene saure Protease dem Pepsin gegenübergestellt, isoliert wurde sie aus der Magenmukosa von Schwein

und Hund. Der Name leitet sich von dem griechischen Wort: *κατεψελν* ab und bedeutet soviel wie Verdauung. Das Enzym unterscheidet sich dadurch vom Pepsin, daß es weniger leicht aus dem Gewebe selektiert werden kann und unter schwach sauren Bedingungen eine stärkere Aktivität zeigt. Damals wurde vermutet, daß das Kathepsin hauptsächlich aus den Gewebeleukozyten stammt. Den Autoren fiel auf, daß viele Zellen und Gewebe ähnliche Aktivität bei schwach saurem pH-Wert zeigten. Sie schlossen deshalb, daß Kathepsin ubiquitär vorhanden war. Heute scheint es zumindest zweifelhaft, ob das Kathepsin aus der Magenmukosa das Kathepsin D war, das in den anderen Geweben vorherrschend ist (4).

Anson fand im Jahre 1940, daß das Pepsin der Magenmukosa eine wesentlich höhere proteolytische Aktivität zeigt als jenes, das in der Milz gefunden wird. Es ist auch schwierig sich heute vorzustellen, wie Willstätter und Bamann in Gegenwart von Pepsin die Aktivität von Kathepsin in der Magenmukosa gefunden haben wollen.

Entscheidend war allein die Prägung des Begriffes 'Kathepsin'.

Proteasen waren auch Gegenstand der Untersuchungen von Grassmann (1932) und Grassmann und Schneider (1936) (4). Anson, der am Rockefeller Institut in Princetown arbeitete, erweiterte die Kenntnisse über das Kathepsin. Er verwendete Hämoglobin als Substrat für die vier bekannten Proteasen: Pepsin, Trypsin, Papain und Kathepsin. Die Verwendung von Hämoglobin bot sich an, da dieses Protein in relativ reinem Zustand hergestellt werden konnte und in großen Mengen vorhanden war.

Das Kathepsin, das von Anson (1937, 1940) teilweise rein gewonnen wurde, war Kathepsin D aus der Rindermilz (4). Die Überlegung Anson's war die, daß die Extrakte aus einer Gruppe von Proteasen, die er Kathepsin nannte, andere proteolytische Enzyme enthalten, die die Spaltprodukte, die von Kathepsin erzeugt werden, weiterverdauen (4).

Fruton und Mitarbeiter (Fruton und Bergmann 1939) (Fruton et al. 1941) stellten fest, daß rohe Präparationen von Kathepsin aus der Rindermilz für verschiedene Substrate Aktivität entfalten (4). Das erste dieser

Enzyme ist ein Substrat des Pepsins, das Kathepsin I (später Kathepsin A), eine Endopeptidase, die wahrscheinlich mit der von Anson gefundenen identisch ist. Kathepsin II (später Kathepsin B) wurde ebenso als Endopeptidase angesehen. Es wurde angenommen, daß die Substratspezifität der von Trypsin und Papain ähnlich ist (4).

Tallan et al. (1952) ordneten die Kathepsine neu, indem sie die Gruppe von Kathepsin A, B und C schufen. Tallan schreibt: "Es ist von Interesse, daß die Fraktionen, die bei einem pH-Wert von 3,5 eine maximale Aktivität gegenüber Hämoglobin haben, nicht mit denen identisch sind, die eine maximale Aktivität für synthetische Substrate bei pH-Wert 3,5 zeigen. Es ist anzunehmen, daß die Hydrolyse dieser Proteine auf ein gemeinsames Zusammenwirken der verschiedenen Endopeptidasen zurückzuführen ist.

Dem zunehmenden Interesse für proteolytische Enzyme und der Fortschritt auf dem Gebiet der Proteasenforschung wurde durch drei internationale Kongresse Rechnung getragen. 1970 fand das Royal Society Wates Symposium über Gewebeproteasen in Cambridge statt, das von A. J. Barrett und J. T. Dingle geleitet wurde. 1973 wurde das Symposium des intrazellulären Eiweißkatabolismus auf Schloß Reinhardsbrunn, Friedrichroda DDR von H. Hanson und P. Bohley veranstaltet. 1975 kam ein internationales Symposium über den intrazellulären Eiweißkatabolismus in Ljubliana, Jugoslawien unter der Mitarbeit von V. Turk, J. Babnik, V. Cotic, F. Gubensek, M. Kopitar und J. Kregar zustande (4).

1.2. Nomenklatur und Klassifikation

1.2.1. Begriffserklärung

Die Nomenklatur der Proteinasen ist schwieriger als die jeder anderen Gruppe von Enzymen.

Proteinasen und Proteasen sind Synonyme, wobei der Ausdruck Protease der ältere ist. Seit 1972 hat sich der Name Proteinase durchgesetzt und wurde in die Enzymnomenklatur aufgenommen. In der älteren Literatur wurden alle Begriffe: Proteasen, Proteinasen und proteolytische Enzyme nebeneinander gebraucht. Sie schloßen sowohl die Endopeptidasen wie auch die Exopeptidasen mit ein.

Die Exopeptidasen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie nur vom Ende der Peptidkette her spalten, also jeweils die endständigen Aminosäuren ablösen. Man unterscheidet hier weiter zwischen Carboxypeptidasen, die von der Carboxygruppe her wirken und Amino-peptidasen, die an der Amino-gruppe angreifen.

Die Endopeptidasen spalten die Proteine an bestimmten Stellen in der Mitte der Aminosäuren, sie greifen das Kettenende nicht an. Ferner wirken sie vorwiegend auf Proteine und höhere Polypeptide (15).

Die Endopeptidasen des Magen-Darm-Trakts werden in Form inaktiver Enzymvorstufen gebildet. Erst durch bestimmte meist proteolytische Umwandlungen entstehen daraus die aktiven Verdauungsenzyme.

Pepsin ist das wichtigste Eiweiß-spaltende Enzym des Magens. In der Magenschleimhaut wird zuerst eine Vorstufe, das Pepsinogen gebildet, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 600. Bei saurer Reaktion oder bei Einwirkung von Pepsin geht es in aktives Enzym über, dabei werden mehrere Peptide abgespalten. Eines dieser Peptide wirkt bei neutraler Reaktion als Inhibitor des Pepsins. Der Pepsin-Inhibitor-Komplex dissoziiert aber im sauren Bereich, während dann das Pepsin den Inhibitor spaltet. Die Gesamtreaktion vom Pepsinogen zum Pepsin verläuft autokatalytisch, denn der katalytische Stoff, das Pepsin, erscheint als Produkt der Reaktion. Das aktive Pepsin ist ein Protein mit dem Molekulargewicht von 34 500, dessen isoelektrischer Punkt ungewöhnlich

niedrig ist (unter 1). Bedingt ist dies durch eine Phosphorsäuregruppe im Molekül, die allerdings für die katalytische Wirkung entbehrlich ist. Pepsin hat sein Wirkungsoptimum bei einem pH-Wert von 1,3-3.

Das Labferment (Rennin, Chymosin) findet sich im Kälbermagen. Das wichtigste Substrat ist das Caseinogen der Milch, das durch das Enzym in das unlösliche Casein umgewandelt wird. Diese Hydrolyse wird auch von Pepsin, Trypsin und anderen Proteasen katalysiert. Beim Menschen entspricht das Rennin dem Gastricsin (Pepsin C).

Kathepsin ist eine Sammelbezeichnung für Proteasen, die bei schwach saurer Reaktion proteolytisch wirken. Trypsin entsteht im Darm aus dem Produkt der Pankreaszellen, dem Trypsinogen. Dieses Proenzym wird durch die im Dünndarm gebildete Enteropeptidase in die aktive Form übergeführt. Die gleiche Wirkung hat das Trypsin selbst. Somit verläuft auch diese Aktivierung autokatalytisch. Chymotrypsin wird wie das Trypsin im Pankreas gebildet und zwar als inaktives Chymotrypsinogen, ein Protein mit dem Molekulargewicht von 25 000.

Papain ist eine pflanzliche Protease aus den Früchten des Papayabaumes mit dem Molekulargewicht von 21 000. In der Spezifität des Angriffsortes ähnelt es dem Pepsin und Chymopepsin. Das pH-Optimum liegt bei neutraler Reaktion. Die Carboxypeptidasen kommen zwar auch in der Niere und in der Milz vor, sind jedoch im Verdauungssekret in besonders großen Mengen enthalten. Die Carboxypeptidase A hat ein Molekulargewicht von 34 000. Im Pankreas wird sie als inaktive Vorstufe (Procarboxypeptidase) vom Molekulargewicht 90 000 sezerniert. Die Spezifität des Enzyms erinnert an die des Chymotrypsins. Besonders leicht werden diejenigen Endgruppen abgespalten, die durch Chymotrypsin freigelegt werden. Dagegen spaltet die Carboxypeptidase B bevorzugt Carboxylendständige, basische Aminosäuren ab. Damit kann sie die durch Trypsinwirkung entstandenen Peptide weiter abbauen. Carboxypeptidasen spalten auch von Proteinen die endständigen Aminosäuren ab. Man verwendet sie deshalb auch in der Proteinchemie zur Endgruppenbestimmung.

Die Amino-peptidasen spalten von einer Peptidzelle die Amino-endständige Aminosäure ab. Sie werden zur Sequenzermittlung von Peptiden herangezogen (15).

Die Enzyme arbeiten als Komponenten eines physiologischen, proteolytischen Systems. Deshalb ist die Spezifität, die durch synthetische Substrate ermittelt wird von untergeordneter Bedeutung. Es können alle Enzyme als Proteinasen angesehen werden. Der Begriff der 'Peptidase', der als Oberbegriff für peptidgebundene Hydrolasen gebraucht werden kann, wird in der Tat für Exopeptidasen oder für Enzyme, die Polypeptidhormone reduzieren gebraucht, ob für exopeptidatische oder endopeptidatische Vorgänge. Es erscheint daher schlüssig, daß Proteinasen Proteine und Peptidasen Peptide spalten.

1.2.2. Prinzipien der Klassifikation

1.2.2.1. Exopeptidasen und Endopeptidasen

Die Teilung der Proteinasen in Endopeptidasen und Exopeptidasen war jahrelang eine klare und sinnvolle Klassifikation. Sie ist immer noch nützlich, stellt aber eine Vereinfachung dar. Es ist lange bekannt, daß Endopeptidasen oft ein Maß für die Exopeptidasenaktivität darstellen. So zeigt sich zum Beispiel, daß die Hydrolyse einer Kette nicht immer durch das Vorhandensein eines angrenzenden Amino- oder Carboxy-Endes verhindert werden kann. Deshalb ist Leu-NH_2 ein Substrat für Chymotrypsin und Arg-NH_2 ein Substrat für Trypsin. Es scheint vielmehr, daß verschiedene Exopeptidasen auch eine geringe Endopeptidaseaktivität besitzen.

Beobachtungen dieser Art werfen die Frage auf, ob nicht die Möglichkeit einer unvollständigen Trennung der Exopeptidasen mit Endopeptidasen gegeben sei. Dies wurde aber durch eine Reihe sorgfältiger Versuche ausgeschlossen. Die lysosomale Carboxypeptidase A (Kathepsin A) wurde hauptsächlich als Carboxypeptidase angesehen, aber die Ergebnisse von Lichtenstein und Fruton (1960) und von Logunov und Orekhovitch (1972) lassen vermuten, daß auch eine Endopeptidaseaktivität besteht. Die lysosomale Carboxypeptidase B (Kathepsin B₂) die von Alfroz et al. (1976) gefunden wurde, scheint ebenfalls begrenzte Endopeptidase-Aktivität zu besitzen (3) (4).

1.2.2.2. Exopeptidasen

Die Exopeptidasen können auf Grund ihrer Substratspezifität in Hauptgruppen eingeteilt werden. Innerhalb dieser Gruppen ist es manchmal einfach wegen der Substratspezifität einen akzeptablen Namen zu finden, zum Beispiel: 'Glycylglycindi-peptidase'. Es gibt aber auch die Möglichkeit den Namen nach der intrazellulären Lokalisation eines Enzyms festzulegen, zum Beispiel: 'lysosomale Carboxypeptidase A'. Entsprechend der Nomenklaturliste von Enzymen aus dem Jahre 1976 werden die Carboxypeptidasen neu gruppiert als 'Saure Carboxypeptidasen'.

Die Klassifikation auf Grund des katalytischen Mechanismus ist sicher sinnvoll bei den Endopeptidasen, mit geklärtem Wirkungsmechanismus, bereitet aber bei den anderen Gruppen Schwierigkeiten, wenn der katalytische Mechanismus nur unvollständig bekannt ist (3) (4).

1.2.2.3. Endopeptidasen

Für die Klassifikation der Endopeptidasen scheint es kein befriedigendes Schema zu geben, das als Grundlage der Einteilung die Spezifität verwendet. Stattdessen wird die Identität der essentiellen katalytischen Gruppe der Enzyme für die Nomenklatur benutzt und in die vier Klassen der Serin-, Sulfhydryl-, Carboxyl- und Metalloproteinasen eingeteilt. Diese Klassifikation geht auf Hartley (1960) zurück. Dies entspricht auch der Einteilung der Enzymnomenklatur von 1972 (Commission on Biochemical Nomenclature 1972).

In einer fünften Gruppe werden Proteinase, die eine ungeklärte katalytische Funktion besitzen, zusammengefasst. Man muß sich teilweise mit Trivialnamen behelfen. Es kann selbstverständlich eine gewisse deskriptive Information in den Namen eingebracht werden. Die deskriptive Namensgebung führte dazu, daß z. B.: Kathepsin D in der Vergangenheit als Milz- β -protease, als Lungen-proteinase I, als saure Thyroid-proteinase und als Adrenal-proteinase I bezeichnet wurde. Deshalb wurde beim Symposium über den intrazellulären Proteinkatabolismus in Friedrichsroda DDR (1973) beschlossen, den Ausdruck Kathepsin den Gewebs- oder zellulären Proteinase zu reservieren. Der Begriff kathepsin sollte nur für Endopeptidasen verwendet werden, aber ohne Einschränkung auf ein pH-Optimum.

1.3. Pathologie der Wundheilung der Haut nach Verbrennungen

Nach Koslowski und Krause tritt bei Verbrennungen und Verbrühungen der Haut mit Temperaturen zwischen 50 und 70 Grad eine Permeabilitätsstörung, bei höheren Temperaturen eine Koagulationsnekrose auf (16). Histologische Veränderungen (Vakilzadeh) zeigen drei Verbrennungsgrade: Bei der Verbrennung I. Grades besteht eine Beschränkung der Veränderungen der Epidermis. In den oberen Schichten der Epidermis finden sich Kernpyknosen und Kernschwellungen sowie auch Kernrupturen, während sich im Stadium basale eine Vakuolisierung nachweisen läßt. Im Corium kommt es zu einer Vasodilatation und zum Ödem (11) (22) (35).

Bei der Verbrennung II. Grades ist die Epidermis blasig abgehoben und weitgehend nekrotisch. Das obere Corium ist teilweise homogenisiert, die Haarfollikel sind in ihrem oberen Drittel nekrotisch. In den Blutgefäßen kann es zu Endothelläsionen sowie zu einer Thrombenbildung kommen (11).

Bei der Verbrennung III. Grades ist die Epidermis und das Corium nahezu völlig nekrotisch. Die Haarfollikel, die Talgdrüsen sowie die Schweißdrüsen sind bis auf einzelne Schweißdrüsenendstücke in der Substanz vollständig zerstört. Es sind ausgedehnte Gefäßwandnekrosen und Thrombosen auch im Bereich der sogenannten Gefäßdrüsenschicht am Übergang zur Subcutis nachzuweisen (35).

Nach der Auffassung von Gordon et al. (11) tritt durch die Einbeziehung der Hautanhangsgebilde in die Verbrennungszone eine Verzögerung der Wundheilung gegenüber den Verbrennungen II. Grades auf. Nach Hernandez, Richter und Struck (12) ist die verzögerte Wundheilung u.a. auf verkohlte organische Rückstände und auf niedermolekulare Substanzen in Verbindung mit dem Auftreten von Infektionen zurückzuführen.

Zimmermann et al. (42) dagegen machen die Fixation der Verbrennungsnekrose durch native Kollagenfasern im umgebenden Gewebe für die verzögerte Wundheilung verantwortlich. Nach Moritz (22) kommt es 24 bis 48 Stunden nach einer Verbrennung III. Grades, das gilt teilweise auch für die Verbrennung II. Grades, zu einer Demarkation der Koagulationsnekrose im Bereich der Epidermis und des Coriums (35).

Bei der Wundheilung sind drei Phasen zu unterscheiden

- a) exsudativ-katabole Phase
- b) proliferativ-anabole Phase
- c) reparative bzw. Narbenphase

Das Bild der exsudativ-katabolen Phase ist gekennzeichnet durch die tiefgreifende Koagulationsnekrose mit Störung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, durch eine Störung der physiologischen Isoionie, Isoosmie und Isotonie, sowie durch freiwerdende Hydrolasen (20).

Gefäßnekrosen mit Thrombenbildung, eine Vasokonstriktion, z.T. infolge der Degranulierung von Mastzellen mit Freisetzung von Heparin, Histamin und Serotonin mit nachfolgender Dilatation. Prästase und Stase führen zu einer Hypoxie bzw. Ischämie des Gewebes und einer damit einhergehenden Exsudation von Blutflüssigkeit und Emigration von kernhaltigen Blutzellen in der Verbrennungszone. Es kommt zu einer hypoxiebedingten Umschaltung auf eine anaerobe Glykolyse mit vermehrter Freisetzung und lokaler Konzentrationserhöhung von Milchsäure, Zitronensäure und Brenztraubensäure und damit zu einer Verstärkung der Gewebsazidose (20) (35).

Die Mucopolysaccharide depolymerisieren und verlieren ihr Wasserbindungsvermögen. Es kommt zum Ödem und zum Aufquellen der kollagenen Fasern. Die Acidose übt einen chemotaktischen Reiz auf Leukozyten und Monozyten bzw. Makrophagen aus, die in die Verbrennungszone emigrieren.

In der proliferativ-anabolen Phase kommt es zu einer Kapillarisation und zu einer Proliferation Lymphozytärer, hämatogener und histiogener Zellen im Entzündungsfeld mit einer Differenzierung in Makrophagen und Fibroblasten. Die Herkunft dieser Zellform, die für die weitere Entwicklung der Wundheilung von entscheidender Bedeutung ist, scheint nach den neuesten Untersuchungen von Büchner et al. (6) geklärt. Die Fibroblasten sind zur Synthese der sauren Mucopolysaccharide bzw. Glykosaminoglykane der Grundsubstanz sowie zur Bildung des Tropokollagens, bzw. der kollagenen Fasern befähigt. Die Fibroblasten des jungen Granulationsgewebes sind gegen Hypoxie bzw. einer Ischämie sehr empfindlich. Nach einer Ischämie kommt es zu einer postischämischen Kernschwellung der

Fibroblasten mit einer Reduktion der Mucopolysaccharid- und Kollagensynthese. Auch der Mangel an Vitamin C und Eiweiß führt zu einer Störung der Mucopolysaccharid- und Kollagensynthese (35).

In der Reparationsphase, die zwischen dem 12. und 14. Tag einsetzt, kommt es zunehmend zu einer Reduktion der Kapillaren und zu einem Reifungs- und Alterungsprozess mit Ausbildung kollagener Fasern, zur Rückbildung der Fibroblasten und zum Schwund entzündlicher Zellen aus dem Entzündungsfeld, d.h. es kommt zur Narbenbildung. Nach Versar und Willenegger dauert dieser Prozess mehrere Jahre (34).

1.4. Pathogenese der Verbrennungskrankheit

Beim Tode eines Menschen durch eine Verbrennungskrankheit sind meistens mehrere Mechanismen und Prozesse beteiligt, die das Versagen eines der großen Funktionskreise herbeiführen (39). Es zeigt sich, daß Schock, Bronchopneumonie und Sepsis bei über 90% der Verstorbenen die Todesursache ist. Dabei stehen in der Häufigkeit Sepsis und Bronchopneumonie an erster Stelle gefolgt vom Schock. Der Schock ist in vielen Fällen eine Folge der Verbrennung, hervorgerufen durch die intensive Störung der Mikrozirkulation, des Flüssigkeitesverlustes und der Elektrolytstörung, Bronchopneumonie und Sepsis sind mittelbare Folgen, für deren Entstehen die Verbrennungskrankheit nicht wegzudenken ist, die aber eines zusätzlichen Faktors "Infektion" bedürfen (39). Die Mehrzahl der Patienten stirbt heute im Zweitstadium der Verbrennung, sie erliegen der sogenannten Verbrennungskrankheit und der damit verbundenen, meist nicht beherrschbaren Sepsis (29).

Als wesentliche Ursache der Verbrennungskrankheit vermuteten Wertheim (1868) und Andakoff (1878) ein in verbranntem Gewebe entstehendes "Verbrennungstoxin" (39). Von verschiedenen Gruppen wurden toxische Bestandteile aus verbranntem Gewebe oder Serum sowohl von Tieren als auch vom Menschen isoliert. Schönberger (1975) konnte aus verbrannter Mäuse- und Menschenhaut, später dann auch aus dem Serum Schwerverbrannter einen weitgehend identischen Lipid-Proteinkomplex mit vitaltoxischer Wirkung auf Empfängerermäuse isolieren (29).

Veränderungen an Struktur und Stoffwechsel der Leber wurden bereits von zahlreichen Autoren beschrieben. So berichtet Zinck (1940) über morphologische Befunde in der Leber schwerverletzter Patienten (39). Bekhum und Peters fanden 1957 eine reduzierte Harnstoffsynthese an Leberschnitten verbrannter Ratten (39).

Köhler et al. (1967/1971) (39) beschrieben eine Einschränkung der Proteinsynthese und eine Verringerung des ATP/ADP-Quotienten der Rattenleber nach Verbrühung. Herrmann et al. zeigten 1965 histochemische Veränderungen der Aktivität verschiedener Enzyme in Leber und Niere der Ratte.

Nach Untersuchungen von Schölmerich et al. (29) ist die deutliche Verschiebung des ATP/ADP- Quotienten zugunsten des ADP ein Indiz für einen gestörten Energiehaushalt der Zelle. Dies könnte zum Teil durch eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung, zum Teil durch eine gestörte Glykolyse bedingt sein. Die Atmungskette als Träger der oxydativen Phosphorylierung ist in den Mitochondrien lokalisiert. Eine toxinbedingte Schädigung mitochondrialer Strukturen führt daher zu einem Energiedefizit mit folgender Einschränkung der ATP- abhängigen Syntheseleistung der Zelle. Die von Köhler et al. (1971) (29) beschriebene Reduktion der Proteinsynthese und die Verminderung der Neubildung von Harnstoff und Glukose lässt sich so erklären.

Sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen findet sich als Todesursache nach schweren Verbrennungen meist eine Sepsis. Es handelt sich dabei gewöhnlich um nur mäßig pathogene Keime. Dies läßt den Schluß zu, daß in der Haut durch thermische Energie eine generalisierte Zellschädigung und eine damit verbundene Schwächung der Abwehr stattfindet, die für den Ausgang der Sepsis und damit für die sogenannte Verbrennungskrankheit verantwortlich ist(29) .

2. Eigene Untersuchungen

Problemstellung:

Sind lokale und systemische Veränderungen bei der Verbrennungskrankheit erklärbar durch Veränderung der Proteasenaktivität und durch eine mögliche Inhibierung evtl. vermeidbar?

2.1. Saure Proteasen

Die Methode zur Bestimmung saurer Proteasen ist hauptsächlich an die Bestimmung von Kathepsin D adaptiert. Hämoglobin ist ein ausgezeichnetes Substrat für dieses Enzym. Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 24 000, lokalisiert in den Lysosomen. Das pH-Optimum liegt bei einem pH-Wert zwischen 2,8 und 5,0. Das Vorkommen von Kathepsin D in vielen Zellen bei verschiedenen Spezies wurde durch die subzelluläre Fraktionierung gezeigt. Das saure pH-Optimum von Kathepsin D gemeinsam mit den lysosomalen Enzymen läßt vermuten, daß es für die Rolle der intrazellulären Verdauung von Proteinen bestens geeignet ist. Die Herstellung von Antiseren gegen Kathepsin D erlaubte die mikroskopische Lokalisierung des Enzyms (42). Das Enzym konnte jedoch nicht nur intrazellulär in den Lysosomen gefunden werden, sondern auch extrazellulär in der Nähe von Zellen, die es sezerniert hatten (26). Es wurde vermutet, daß lebende Leukozyten in der Lage seien, für die extrazelluläre Funktion lokal ein saures Milieu hervorzurufen (7). Die Analyse anderer Enzyme hat offenbar keine große Bedeutung im Vergleich zu Kathepsin D.

Kathepsin B, das zu den Thiolendopeptidasen gehört, hat ein pH-Optimum von 3,5 bis 6,0. Mit Hämoglobin als Substrat bewegt sich das pH-Optimum von 4,0 bis 4,5. Kathepsin B ist bei den verschiedenen Spezies sicher weit verbreitet.

Kathepsin H und Kathepsin L, ebenfalls Thiolendopeptidasen, wurden in den Lysosomen der Rattenleber nachgewiesen. Das pH-Optimum liegt zwischen 5,0 und 6,0. Die Analyse der Aktivitäten dieser Enzyme im Magen gelingt wegen der Anwesenheit von Pepsin mit einem pH-Optimum zwischen 1,0 und 2,0 nur teilweise.

2.2. Neutrale Proteasen

Nach den bisherigen Untersuchungen gibt es kein Enzym, das eine besondere Substratspezifität für Hämoglobin unter neutralen pH-Bedingungen besitzt.

Von Riekkinen und Rinne (4) ist eine neutrale Gehirnprotease mit Substratspezifität für Casein und Hämoglobin beschrieben, die aus einer Rattengehirnfraktion stammte und ein pH-Optimum bei 7,0 bis 7,2 besaß. Die anderen beschriebenen Proteasen, die bei neutralem pH-Wert wirksam sind, besitzen lediglich eine Gruppenspezifität.

Ohlsen (24) beschreibt zwei Kollagenasen und drei Elastasen aus menschlichen Granulozyten, wobei die Kollagenasen ein Molekulargewicht von etwa 34 000 und ein pH-Optimum von 8,5 aufweisen. Das Ergebnis der Aminosäurenanalyse zeigt, daß die chemischen Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen gering sind. Die Granulozytenkollagenase zeigt ähnliche Reaktionen wie die Hautkollagenase. Die Elastasen hydrolysieren nicht nur natives Elastin, sondern haben eine breite Substrataktivität. Die Granulozytenkollagenasen und Elastasen werden sowohl von α_1 -Antitrypsin als auch von α_2 -Makroglobulin inhibiert bzw. gebunden.

A. Janoff et al. (14) zeigen, daß der neutrophilen Elastase eine wichtige Aufgabe bei den physiologischen und pathologischen Interaktionen des Menschen zukommt.

Die Elastase ermöglicht die Auflösung der Bakterienwände. Eine andere physiologische Rolle liegt vielleicht in der Verdauung des Protoplastenproteins. Ferner greift die Elastase die elastischen Fasern und andere verbindende Komponenten des Gewebes an.

2.3. Methodik

2.3.1. Saure Proteasen

Es wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 220 g verwendet. Die dritt-gradigen Verbrennungen, die 15 % der Körperoberfläche betrug, wurden durch Kontamination mit 90 Grad Celsius heißem Wasser für die Dauer von 15 Sekunden hervorgerufen (41). Am 10. Tag wurden die Nekrosen abgetragen und die verbrannte Haut bis zur biochemischen Untersuchung tiefgefroren. Die Tiere wurden unter aseptischen Bedingungen gehalten. Zwischen dem 12. und 18. Tag wurden die Tiere entblutet, die Organe entnommen und ebenfalls tiefgefroren. Nach Herstellung einer Gewebesuspension von 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Gewebe mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel) 30 Sekunden lang bei Kühlung mit Eiswürfeln homogenisiert.

Vor Entnahme der intakten Haut wurden die Versuchstiere rasiert. Die Gewebssuspension wurde mit 30 000 g bei 4 Grad Celsius 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Untersuchungen verwendet. Um die Aktivität der sauren Proteasen zu messen, modifizierten wir die Methode von Barrett (2), die auf die Untersuchungen von Anson (1) zurückgeht. Als Substrat wurde reines lyophilisiertes Rinderhämoglobin verwendet. (Serva Heidelberg; Proteasensubstrat von Anson). Es wurde eine Lösung von 8 % (w/v) hergestellt.

Als Pufferlösung wurde ein 1-molarer Natriumformiat-Puffer mit einem pH 3 verwendet. Der Ansatz, der einen pH von 3,2 hatte, setzte sich folgendermaßen zusammen:

0,25 ml Natriumformiat-Puffer

0,25 ml Hämoglobinlösung

0,5 ml Enzymlösung

Die Lösung wurde bei 45 Grad Celsius für 90 Minuten inkubiert und schließlich durch Zugabe von 5 ml 3%-iger Trichloressigsäure gestoppt. Der Ansatz wurde nun erneut gemixt und für weitere 10 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung mit Selecta-Filterpapier Nr. 595 1/2 filtriert

und die Testwerte photmetrisch im UV-Bereich bei 280 nm ermittelt.

Für den Kontrollansatz wurde sofort nach Zugabe der Enzymlösung Trichlor-essigsäure zugesetzt. Die Untersuchungslösungen wurden jeweils doppelt angesetzt und jedes Testfiltrat gegen ein Leerfiltrat gemessen.

Die units der Enzymaktivität entsprechen dem Ansteigen in der Extinktion (bei E 280) um 1 unit (Skalenteil). Die Bestimmung des Proteins wurde nach der Biuret-Methode nach Weichselbaum durchgeführt (40).

Die Ergebnisse wurden mit dem T-Test von Student für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz statistisch bearbeitet.

2.3.2. Neutrale Proteasen

Zur Bestimmung der neutralen Proteasen, die parallel zur Bestimmung der sauren Proteasen durchgeführt wurde, ist die Methode zur Bestimmung der sauren Proteasen nach Barrett modifiziert worden. Als Pufferlösung wurde ein 0,1 molarer Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,6 verwendet.

Die Versuchsansätze setzten sich zusammen aus:

0,25 ml Phosphatpuffer
0,25 ml Hämoglobinlösung
0,5 ml Enzymlösung

Das Testverfahren ist mit der Methode der sauren Proteasen identisch.

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde nach der Biuret-Methode nach Weichselbaum (40) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem T-Test von Student für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz statistisch bearbeitet.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu zeigen, wurde in Versuchen eine Beziehung zwischen Enzymaktivität, Enzymkonzentration und der Zeit hergestellt.

Der Testansatz bestand aus:

0,25 ml Enzymlösung (0,5 ml, 0,75 ml)
0,25 ml Hämoglobinlösung
0,25 ml Phosphatpuffer

Die Aktivität wurde nun mit den verschiedenen Enzymkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Es ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Enzymaktivität und Enzymkonzentration, wie der Kurvenverlauf der Abb. 1 zeigt.

Ferner wurden Eichkurven für die getesteten Organe: Leber, Niere, Milz, Magen und Haut in Abhängigkeit von der Zeit aufgestellt. Abb. 2

E (Extinktion)

Abbildung 1: Testansatz mit verschiedenen Enzymkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit

1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1

3

2

1

30 45 60 75 90 105

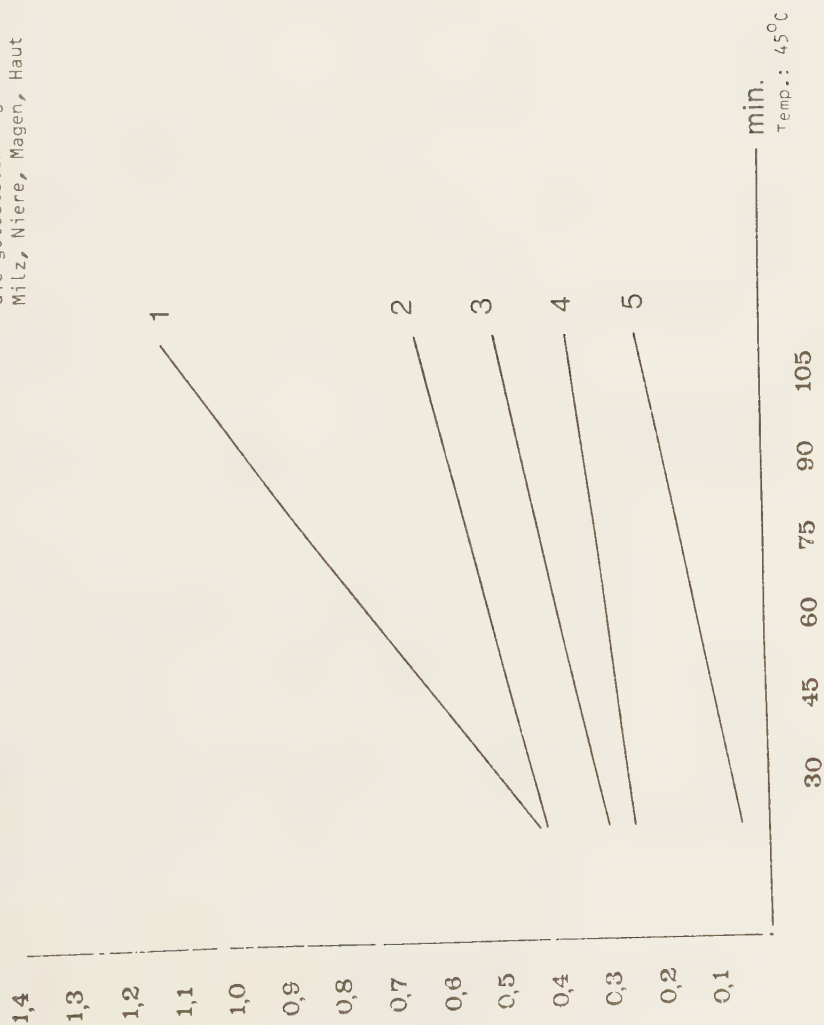
min.

Temp.: 45° C

1, 0,25ml Enzym
2, 0,50ml Enzym
3, 0,75 ml Enzym

Abbildung 2: Aufstellung der Eichkurven für
die getesteten Organe: Leber,
Milz, Niere, Magen, Haut

E (Extinktion)



1, LEBER
2, MILZ
3, NIERE
4, MAGEN
5, HAUT

2.4. Ergebnisse

2.4.1. Saure Proteasen

Untersuchung der Aktivitätsänderung von sauren Proteasen in den verschiedenen Stadien der Verbrennungskrankheit.

Die Enzymaktivitäten wurden in folgenden Organen geprüft: Leber, Milz, Niere, Magen, Haut und im Verbrennungsareal.

In den untersuchten Organen (Leber, Niere, Haut und Haut verglichen mit dem Verbrennungsareal) war die Enzymaktivität der Versuchstiere, bezogen auf g Frischgewicht, verglichen mit den Kontrolltieren deutlich erhöht. Signifikante Unterschiede bezogen auf mg/Protein wurden in der Leber, der Milz, der Niere und dem Magen nachgewiesen. Bezogen auf g Frischgewicht war eine signifikante Aktivitätserhöhung der Niere und der Haut zu beobachten. Die Enzymaktivität der Leber zeigte einen geringen Anstieg, während an Magen und Milz keine deutlichen Enzymveränderungen festgestellt werden konnten.

Besonderes Interesse wurde den Veränderungen der Haut, als primär geschädigtes Organ zugewandt. Es wurden untersucht:

1. Normale Haut
2. Nicht verbrannte Haut, die weit entfernt von der Verbrennungsstelle entnommen wurde.
3. Verbrannte Haut, die während der Nekrosenabtragung am 10. Tag nach der Verbrennung entnommen wurde.

Bezogen auf g Frischgewicht zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der unverbrannten und verbrannten Haut. Die Aktivität der geschädigten Tiere war ca. zweimal so groß wie bei den Kontrolltieren. Beim Vergleich der intakten Haut der Versuchstiere zu den Kontrolltieren zeigte sich ebenfalls eine signifikante Enzymaktivitätserhöhung der sauren Proteasen. Bezogen auf mg Protein waren keine signifikanten Aktivitätsänderungen nachzuweisen (siehe Tab. 1,2 und Abb. 3,4).

Tabelle 1: E / g FG Saure Proteasen : Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	Kontrolltiere			s	n	Versuchstiere			p
	n	x	v			x	v	s	
Leber	13	10,286	1,971	1,403	10	11,162	4,249	2,061	0,15
Milz	13	16,438	4,342	2,083	10	16,258	3,040	1,743	0,45
Niere	13	13,946	3,004	1,733	10	16,054	4,102	2,025	0,01
Magen	8	23,895	4,404	2,098	10	23,286	0,933	0,965	0,25
Haut	13	6,761	1,878	1,370	10	8,318	1,238	1,112	0,005
Haut Nekrose	13	6,758	1,885	1,372	10	12,212	1,016	1,007	0,005
Haut verb. Nekrose	10	8,318	1,238	1,112	10	12,212	1,016	1,007	0,005

$\frac{E}{FG}$
Extinktion/g
Frischgewicht

Abbildung 3: Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

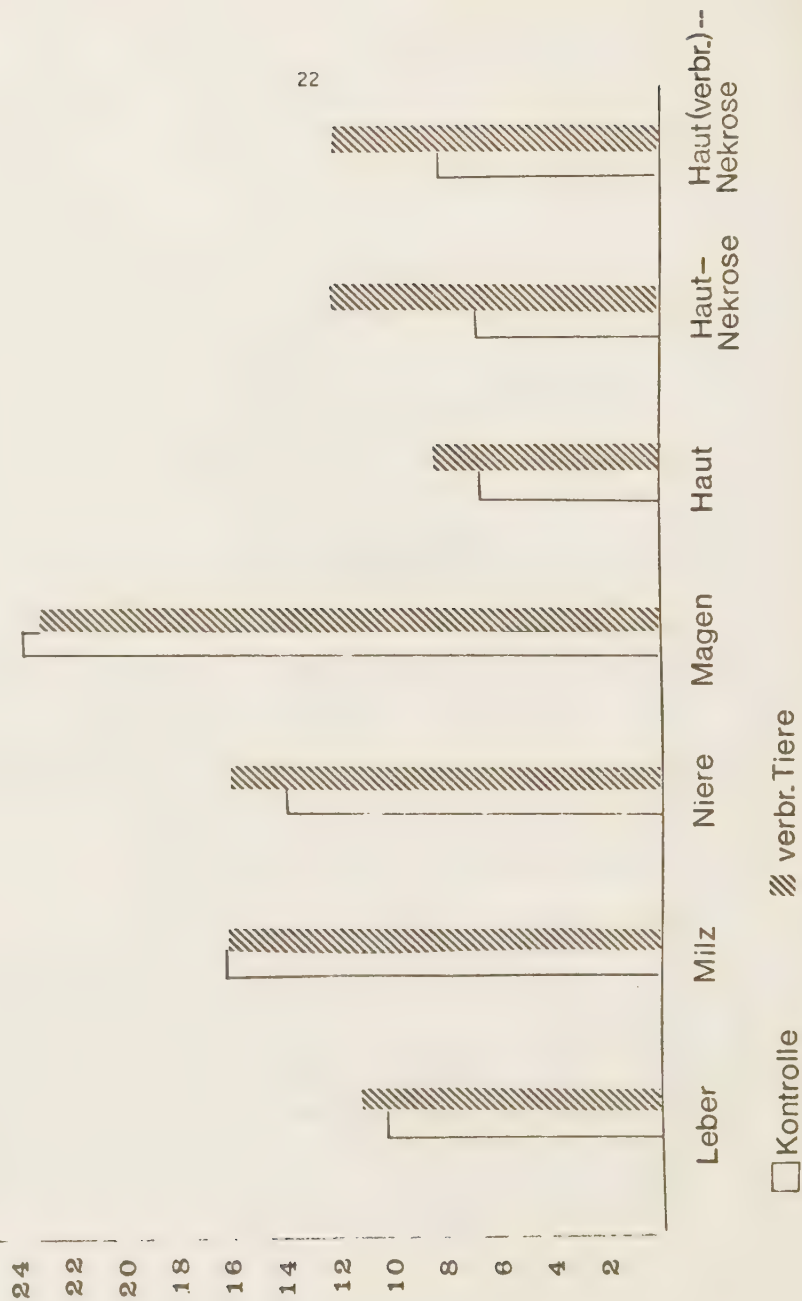


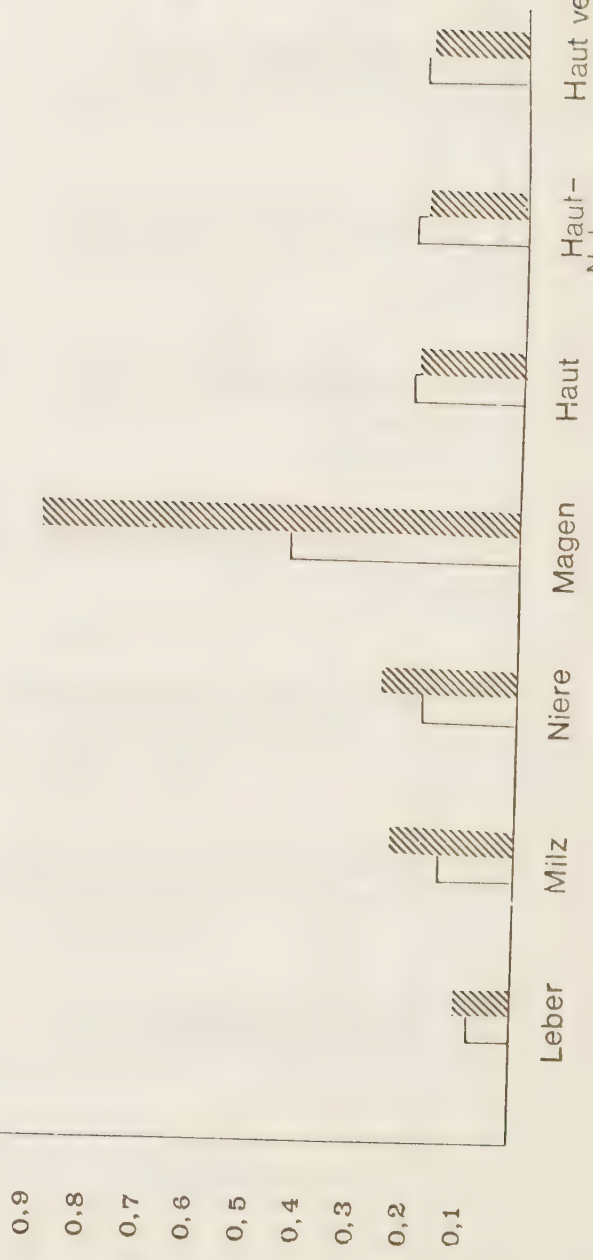
Tabelle 2: E / mg Protein Saure Proteasen: Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

Werte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere			n	Versuchstiere			p
		x	v	s		x	v	s	
Leber	13	0,089	0,00126	0,0355	10	0,106	0,000736	0,0271	0,05
milz	13	0,145	0,00128	0,0358	10	0,232	0,00777	0,0881	0,01
Niere	13	0,174	0,00234	0,0484	10	0,255	0,00798	0,0893	0,0125
Magen	8	0,426	0,0200	0,1414	10	0,898	0,1337	0,365	0,0025
Haut	13	0,224	0,011	0,1048	10	0,199	0,0068	0,0824	0,30
Haut Nekrose	13	0,224	0,011	0,1048	10	0,182	0,0292	0,1708	0,30
Haut verb. Nekrose	10	0,199	0,0068	0,0824	10	0,182	0,0292	0,1708	0,40

$E/mg \text{ Prot.}$
Extinktion/mg Protein

Abbildung 4: Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren



An einer Testreihe wurde die Verbrennungswunde der Ratten artifiziell mit *Pseudomonas aeruginosa* kontaminiert.

Der Vergleich der Enzymaktivitäten der Kontrollgruppe mit der Gesamtheit der verbrannten Tiere, also verbrannte und verbrannt infizierte Tiere, zeigte, bezogen auf mg Protein signifikante Aktivitätserhöhungen der Milz, der Niere und des Magens.

Die Leber der Versuchstiere zeigt eine geringe Erhöhung der Proteasenaktivität gegenüber den Kontrolltieren, während die Proteasenwerte der Haut der verbrannten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Aktivitätsunterschiede erkennen ließen.

Bezogen auf g Frischgewicht war eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität der Niere und der Nekrose im Vergleich zur Haut festzustellen.

Die Leber und die Milz zeigten eine geringe Erhöhung der Proteasenaktivität gegenüber den Kontrolltieren, während die Proteasenaktivität der verbrannten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren im Magen vermindert war (siehe Tab. 3,4 und Abb. 5,6).

Tabelle 3: E / g FG Saure Proteasen Ergebnisse : Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere			n	Versuchstiere (inf. und nicht inf.)			
		x	v	s		x	v	s	p
Leber	13	10,286	1,971	1,403	16	10,652	3,424	1,850	0,30
Milz	13	16,438	4,342	2,083	16	16,632	2,519	1,587	0,40
Niere	13	13,946	3,004	1,733	16	15,906	2,708	1,645	0,0025
Magen	8	23,895	4,404	2,098	16	23,452	1,009	1,004	0,30
Haut	13	6,761	1,878	1,370	16	17,516	1,963	1,401	0,10
Haut Nekrose	13	6,761	1,878	1,370	16	10,906	4,173	2,042	0,0005
Haut verb. Nekrose	16	7,520	1,980	1,407	16	10,906	4,173	2,042	0,0005

Abbildung 5: Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)

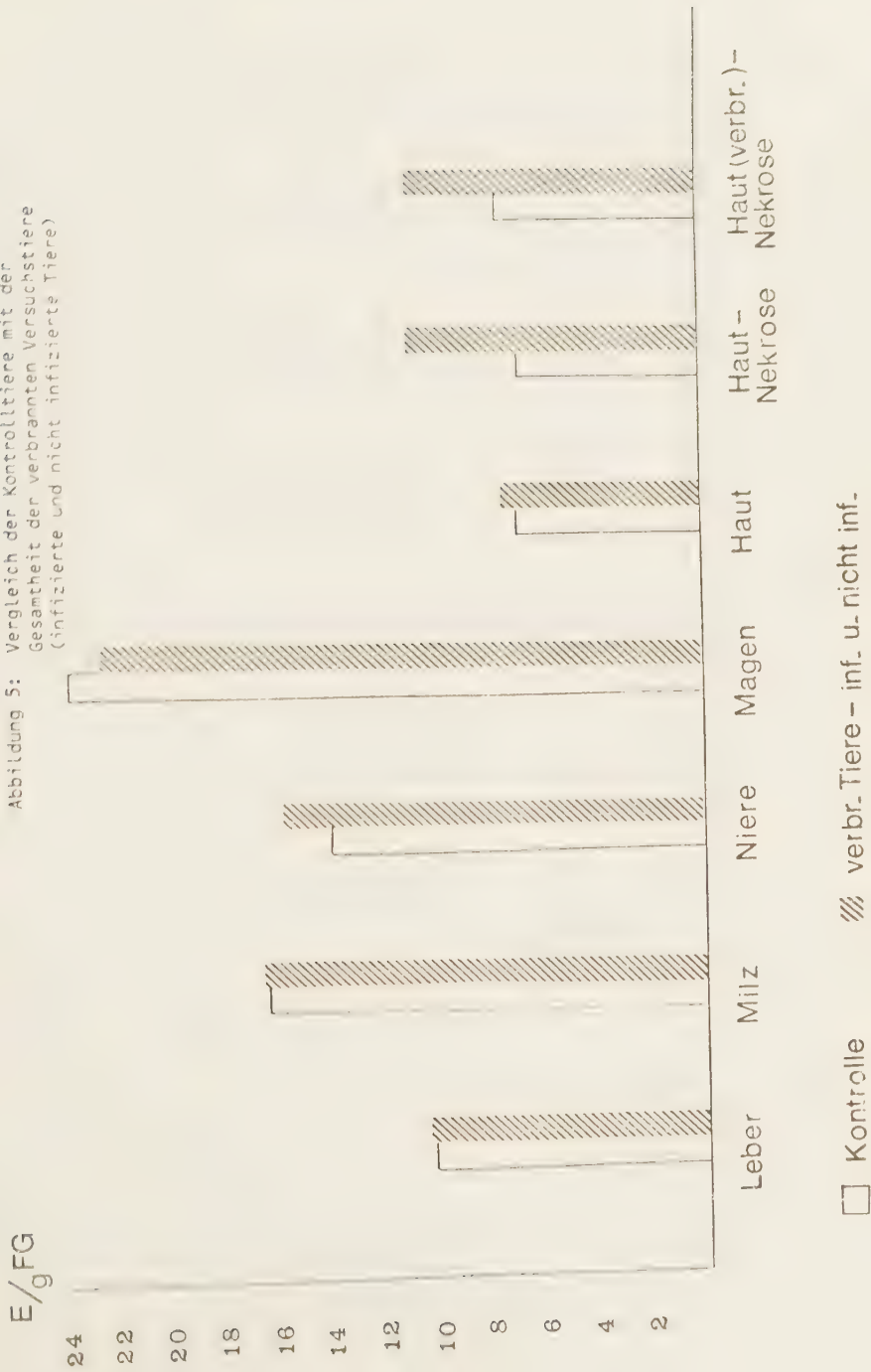
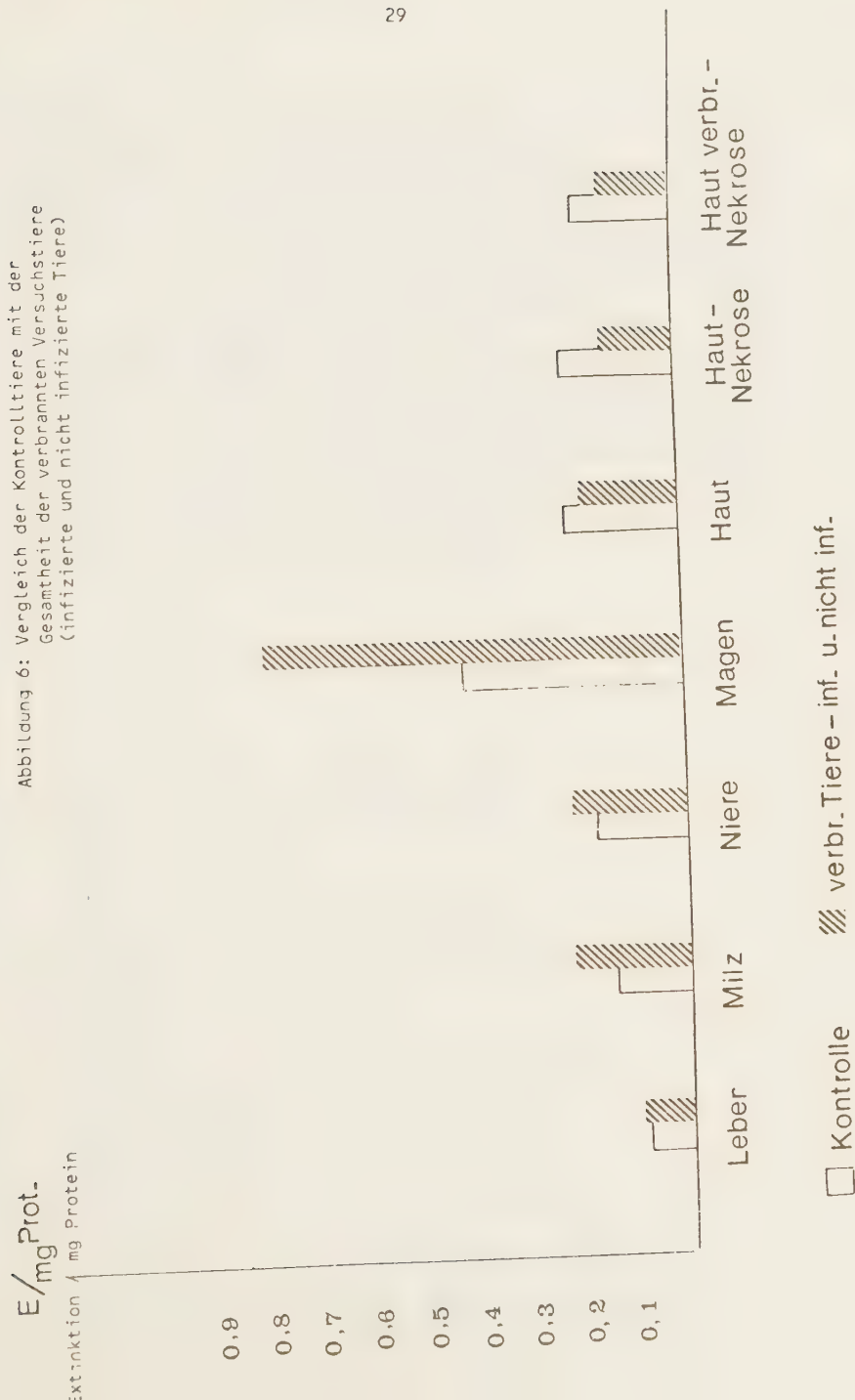


Tabelle 4: E/ mg Protein Saure Proteasen : Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere			s	n	Versuchstiere (inf. und nicht inf.)			
		x	v				x	v	s	p
Leber	13	0,089	0,00126		0,0355	16	0,098	0,000617	0,0248	0,10
Milz	13	0,145	0,00128		0,0358	16	0,223	0,00603	0,0776	0,0025
Niere	13	0,174	0,00234		0,0484	16	0,220	0,00694	0,0833	0,05
Magen	8	0,426	0,0200		0,1414	16	0,805	0,104	0,322	0,0005
Haut	13	0,224	0,011		0,1048	16	0,191	0,00419	0,0647	0,20
Haut Nekrose	13	0,224	0,011		0,1048	16	0,146	0,0201	0,141	0,55
Haut verb16 Nekrose		0,192	0,00425		0,0651	16	0,146	0,0201	0,141	0,15

Abbildung 6: Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)



Der Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und zusätzlich infizierten Tieren erbrachte eine signifikante Aktivitätserhöhung bezogen auf mg Protein in der Milz und im Magen bei den verbrannten und infizierten Versuchstieren. Die Proteasenaktivität der Haut und der Niere der Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren war vermindert. Die Enzymaktivität in der Leber war sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den verbrannten und infizierten Versuchstieren gleich hoch.

Bezogen auf g Frischgewicht war eine signifikante Enzymaktivitätserhöhung der verbrannten und infizierten Tiere in der Niere und der Nekrose gegenüber der Haut zu sehen. Die Proteasenaktivität der Milz der verbrannten und infizierten Tiere war gegenüber den Kontrolltieren ebenfalls erhöht. Die Leber der Versuchstiere zeigte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine verminderte Enzymaktivität (siehe Tab. 5,6 und Abb. 7,8).

Tabelle 5: E / g FG Saure Proteasen : Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	Kontrolltiere			Versuchstiere (Inf.)					p
	n	x	v	s	n	x	v	s	
Leber	13	10,286	1,971	1,403	6	9,810	1,229	1,108	0,25
Milz	13	16,438	4,342	2,083	6	17,256	1,336	1,155	0,15
Niere	13	13,946	3,004	1,733	6	15,660	0,623	0,789	0,005
Magen	8	23,895	4,404	2,098	6	23,730	1,200	1,095	0,45
Haut	13	6,761	1,878	1,370	6	6,190	0,315	0,561	0,45
Haut	13	6,761	1,878	1,370	6	8,730	1,596	1,263	0,005
Nekrose									
Haut verb.	6	6,190	0,315	0,561	6	8,730	1,596	1,263	0,0025
Nekrose									

Abbildung 7: Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren

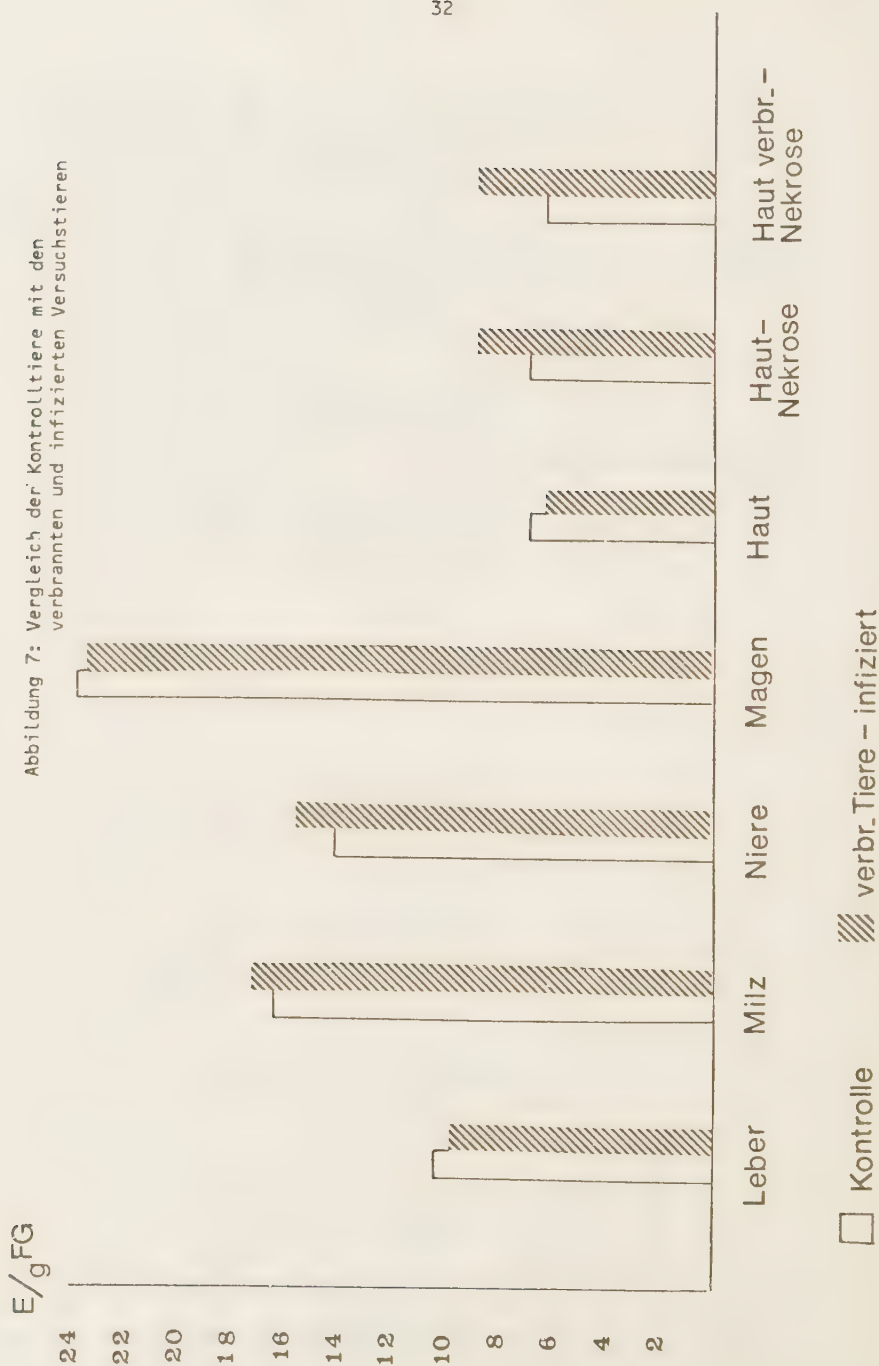
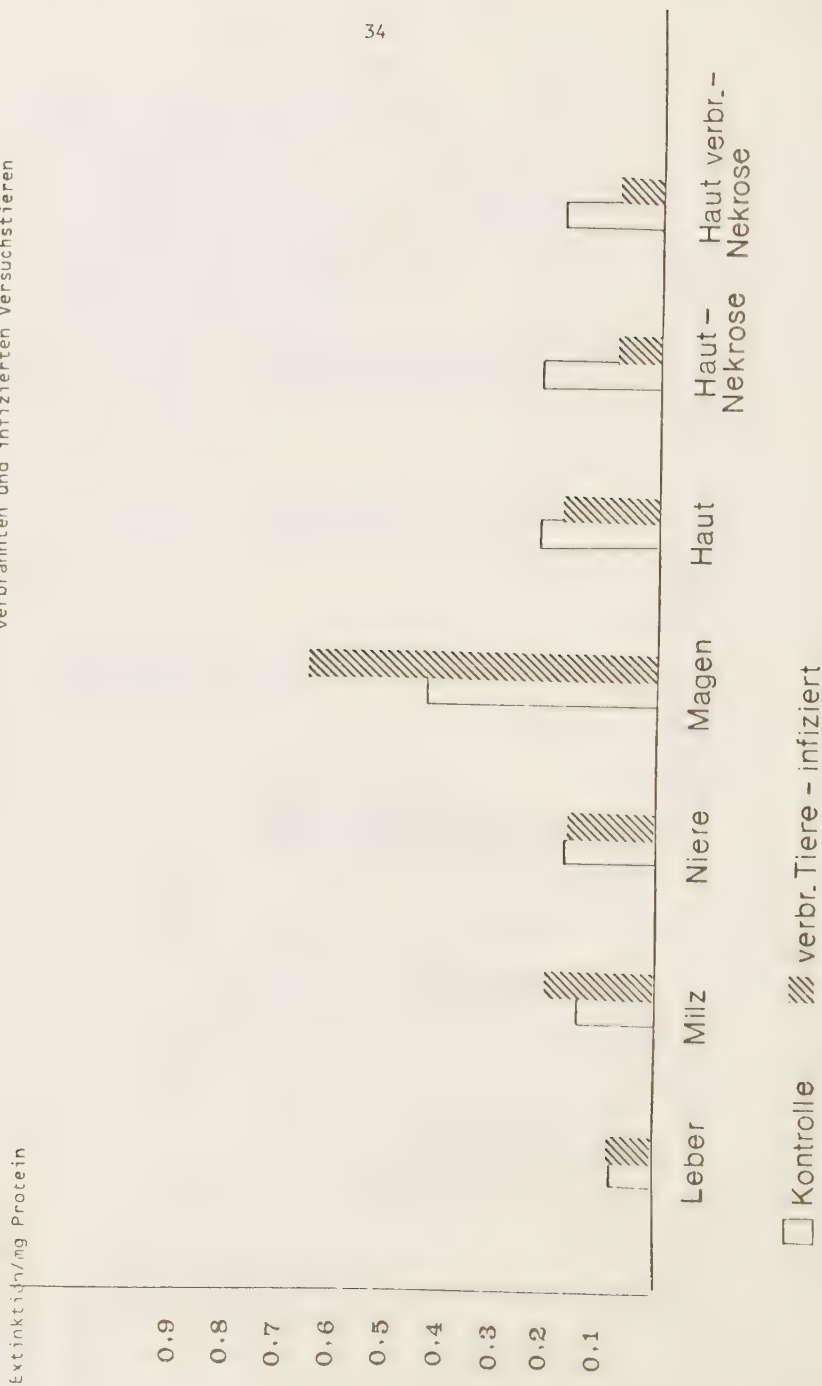


Tabelle 6: E / mg Protein Saure Proteasen: Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	Kontrolltiere			Versuchstiere (inf.)				p
	n	x	v	s	n	x	v	s
Leber	13	0,081	0,00126	0,0355	6	0,084	0,000142	0,0193
Milz	13	0,145	0,00128	0,0358	6	0,208	0,00367	0,606
Niere	13	0,174	0,00234	0,0484	6	0,103	0,000111	0,1056
Magen	8	0,426	0,0200	0,1414	6	0,6506	0,0267	0,1634
Haut	13	0,224	0,011	0,1048	6	0,179	0,000192	0,0138
Haut Nekrose	13	0,224	0,011	0,1048	6	0,086	0,000891	0,0298
Haut verb. Nekrose	6	0,179	0,000192	0,0138	6	0,086	0,000891	0,0298

Abbildung 8: Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren



Beim Vergleich der Gruppe der verbrannten Tiere mit der Gruppe der verbrannten und infizierten Tiere zeigten sich, bezogen auf mg Protein signifikante Aktivitätsverminderungen der Leber, der Niere und des Magens bei den infizierten Versuchstieren. Ebenso war in der Milz und der Haut eine verminderte Proteasenaktivität der infizierten Tiere festzustellen.

Bezogen auf g Frischgewicht konnte man bei den infizierten Tieren eine signifikante Aktivitätsverminderung der Haut feststellen. Die Proteasenaktivität der Leber und der Niere war bei den infizierten Tieren ebenfalls vermindert, während die Enzymaktivität der Milz und des Magens bei den infizierten Versuchstieren erhöht war (siehe Tab. 7,8 und Abb. 9,10).

Tabelle 7: E / g FG Saure Proteasen: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Versuchstiere (nicht inf.)			n	x	Versuchstiere (inf.)			p
		x	v	s			x	v	s	
Leber	10	11,162	4,249	2,061	6	9,810	1,229	1,108	0,1	
Milz	10	16,258	3,040	1,743	6	17,256	1,336	1,155	0,1	
Niere	10	16,054	4,102	2,025	6	15,660	0,623	0,789	0,3	
Magen	10	23,286	0,933	0,965	6	23,730	1,200	1,095	0,2	
Haut	10	8,318	1,238	1,112	6	6,190	0,315	0,561	0,0005	

Abbildung 9: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren

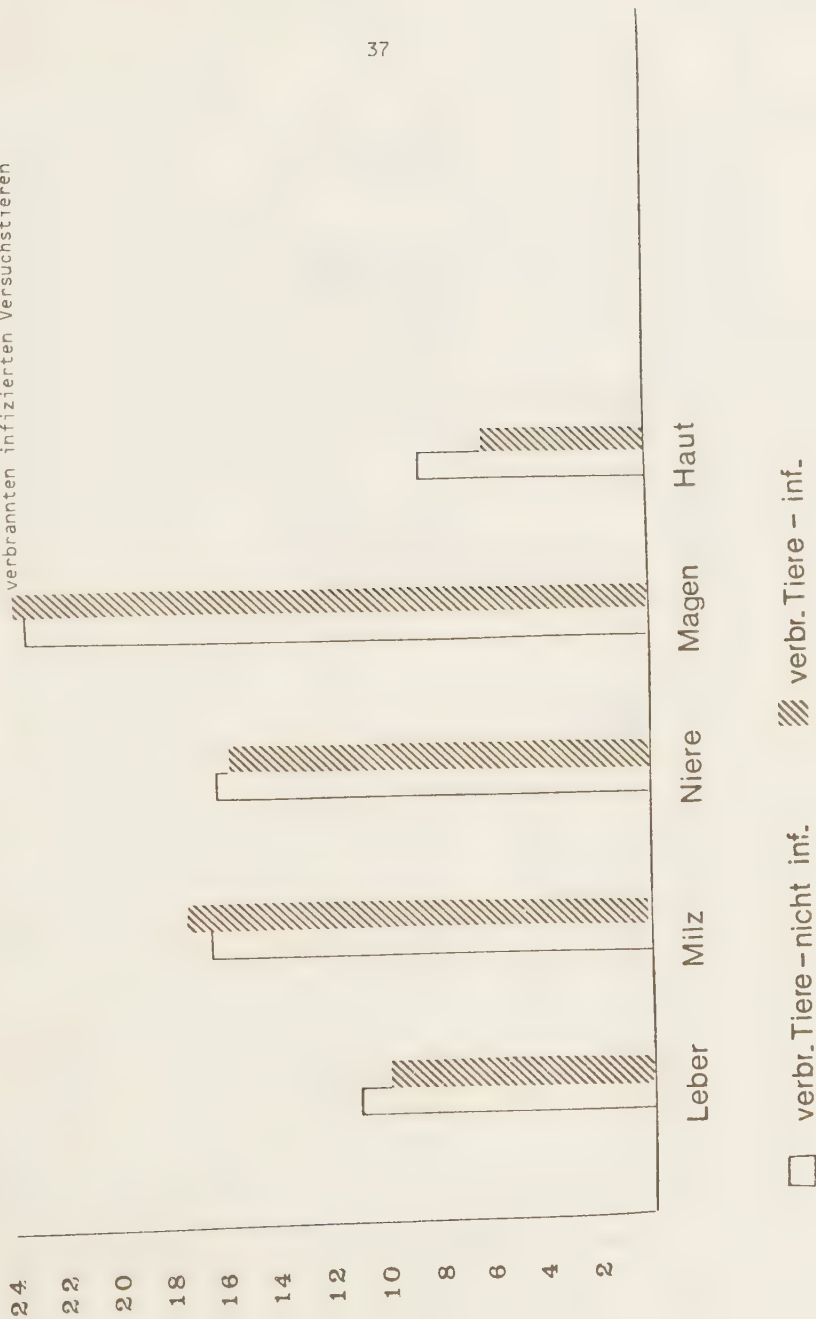
 $\bar{E}/g_{FG}$


Tabelle 8: E/ mg Protein Saure Proteasen : Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

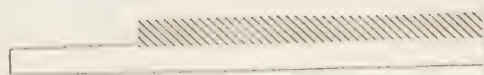
	n	Versuchstiere (nicht inf.)			n	Versuchstiere (inf.)			p
		x	v	s		x	v	s	
Leber	10	0,106	0,000736	0,0271	6	0,084	0,000142	0,0193	0,025
Milz	10	0,232	0,00777	0,0881	6	0,208	0,00367	0,606	0,30
Niere	10	0,255	0,00798	0,0893	6	0,163	0,000111	0,1056	0,01
Magen	10	0,898	0,1337	0,365	6	0,6506	0,0267	0,1634	0,05
Haut	10	0,199	0,0068	0,0824	6	0,179	0,000192	0,0138	0,25

E/mg Prot.

(Extinktion/mg Protein)

Abbildung 10: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit 200 verbrannten infizierten Versuchstieren

0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1



Leber Milz Niere Magen Haut

□ verbr. Tiere - nicht inf.

▨ verbr. Tiere - inf.

2.4.2. Neutrale Proteasen

Untersuchung der Aktivitätsänderung von neutralen Proteasen im Spätstadium der Verbrennungskrankheit. Die Enzymaktivitäten wurden in folgenden Organen geprüft:

Leber, Milz, Niere, Magen, Haut und im Verbrennungsareal.

Es zeigt sich hier ein unterschiedliches Verhalten der Enzymaktivitäten. Bezogen auf mg Protein ist eine signifikante Aktivitätsverminderung der verbrannten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Leber, eine signifikante Aktivitätserhöhung in der Milz zu sehen. Bezogen auf g Frischgewicht bestätigt sich die signifikante Enzymaktivitätsverminderung der verbrannten Tiere in der Leber, beim Magen ist eine signifikante Aktivitätserhöhung nachzuweisen. Auch hier wurde den Aktivitätsänderungen der Haut als primär geschädigtes Organ bei der Verbrennung besonderes Interesse zugewandt.

Es wurde untersucht:

1. normale Haut
2. nicht verbrannte Haut, die weit entfernt von der Verbrennungsstelle entnommen wurde
3. verbrannte Haut, die während der Nekrosenabtragung am 10. Tag nach der Verbrennung entnommen wurde.

Bezogen auf mg Protein zeigten sich hier signifikante Aktivitätsvermindierungen der Haut der verbrannten Tiere und der Vergleich der Nekrose mit der Haut. Bezogen auf g Frischgewicht war ebenfalls eine Enzymaktivitätsverminderung der verbrannten Versuchstiere nachzuweisen (siehe Tab. 9,10 und Abb. 11,12).

Tabelle 9: E / g FG Neutrale Proteasen : Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	Kontrolltiere			s	n	Versuchstiere (verb. nicht inf.)				
	x	v	x			v	s	p		
Leber	15	7,194	1,181	1,0867	15	4,421	1,115	1,0559	0,0005	
Milz	13	5,972	1,656	1,286	10	7,190	10,433	3,230	0,15	
Niere	13	3,472	0,314	0,560	10	3,364	0,587	0,766	0,4	
Magen	10	3,868	0,436	0,660	15	2,413	0,591	0,768	0,0005	
Haut	14	1,734	0,901	0,949	15	1,137	1,464	1,2099	0,1	
Haut Nekrose	14	1,734	0,901	0,949	15	1,268	0,1625	0,4031	0,1	
Haut verb. Nekrose	15	1,137	1,464	1,2099	15	1,268	0,1625	0,4031	0,4	

E/FG
(Extinktion/g Frischgewicht)

Abbildung 11: Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

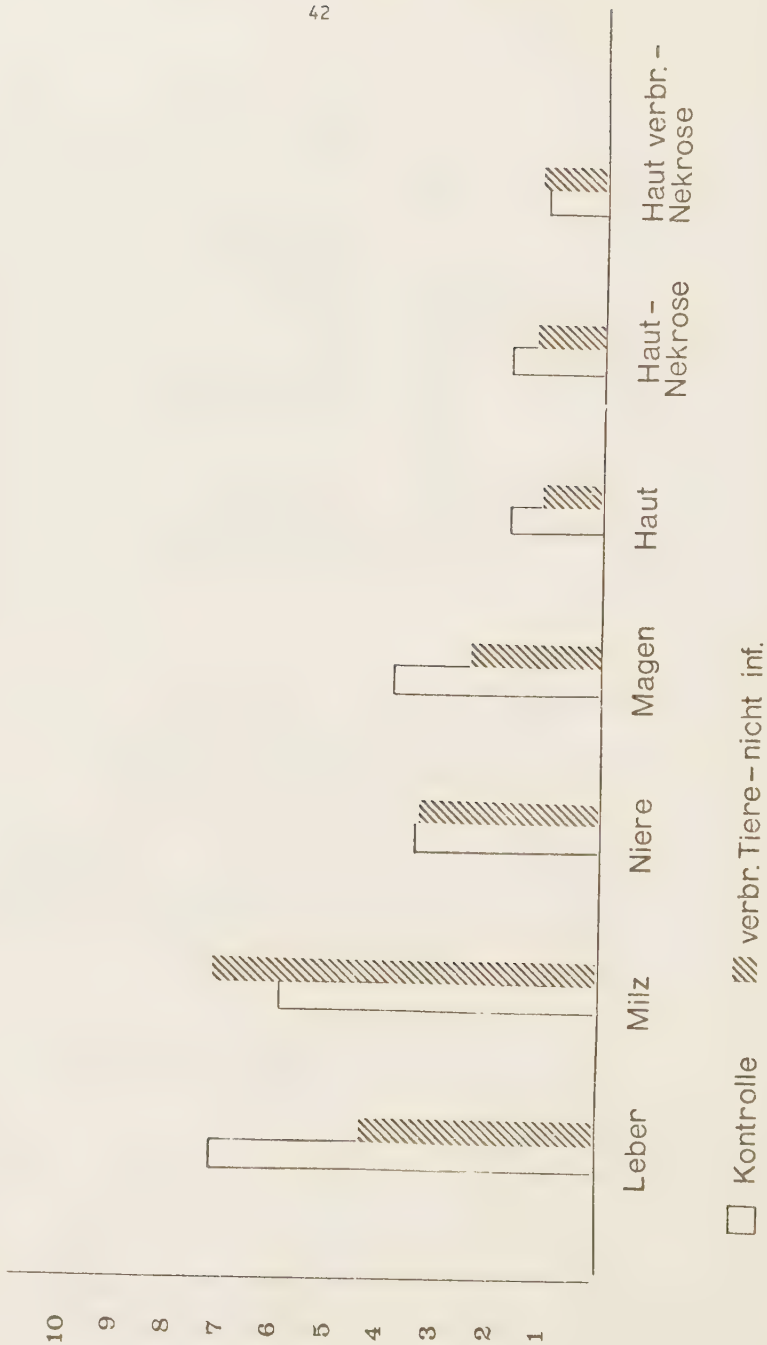


Tabelle 10: E / mg Protein Neutrale Proteasen: Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	Kontrolltiere			Versuchstiere (nicht inf.)			p
	n	x	v	s	x	v	
Leber	15	0,053	0,000269	0,0164	0,039	0,00089	0,005
Milz	13	0,0522	0,000275	0,0165	0,093	0,00197	0,01
Niere	13	0,043	0,000237	0,0153	0,052	0,000422	0,15
Magen	10	0,066	0,000482	0,0219	0,082	0,00305	0,15
Haut	14	0,061	0,00221	0,0470	0,020	0,0000954	0,005
Haut Nekrose	14	0,061	0,00221	0,0470	0,016	0,0000907	0,0025
Haut verb. 14 Nekrose	14	0,020	0,0000954	0,00972	0,016	0,0000907	0,20

E/mg Prot.
(Extinktion/mg Protein)

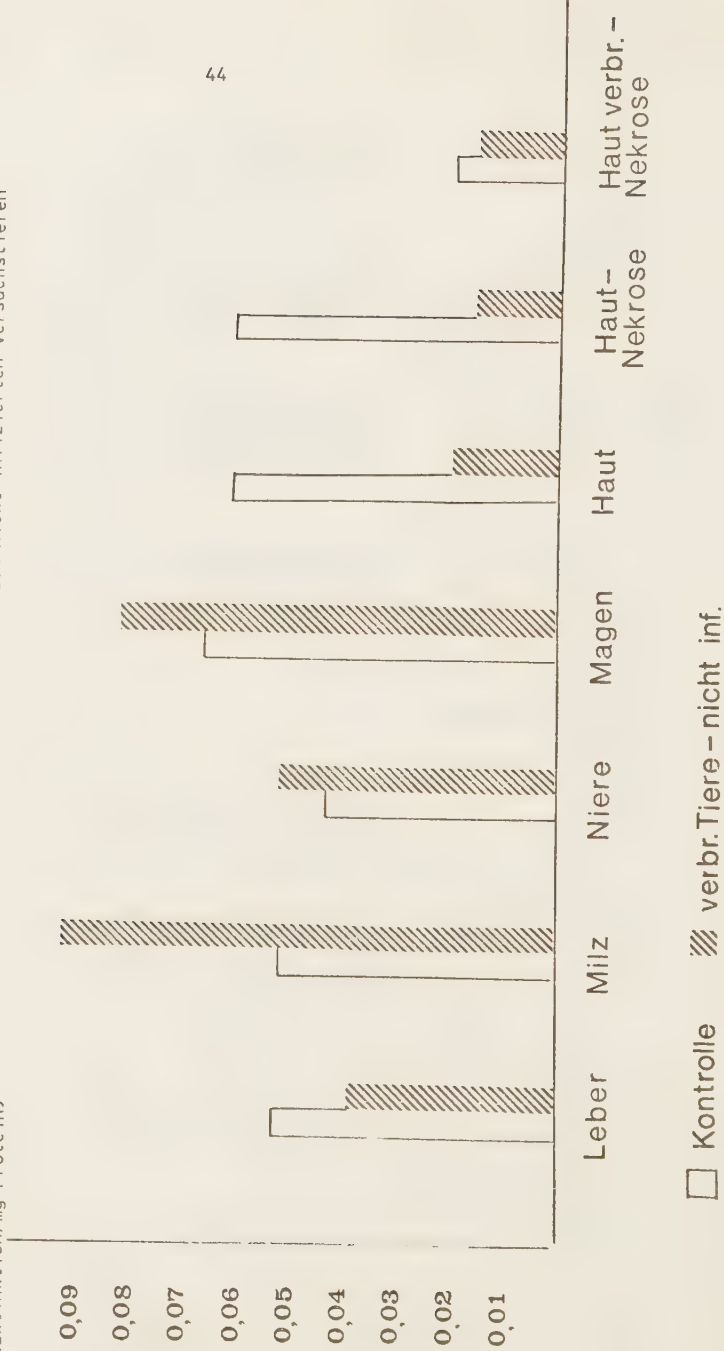


Abbildung 12: Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren

Der Vergleich der Enzymaktivitäten der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der Versuchstiere, also verbrannte und verbrannte mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierte Tiere, zeigte bei den geschädigten Tieren bezogen auf mg Protein eine signifikante Aktivitätsminderung der Leber, der Haut, der Nekrose verglichen mit der Haut und der Nekrose verglichen mit der verbrannten Haut. Eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität der verbrannten und der verbrannten und infizierten Tiere konnte in der Milz nachgewiesen werden.

Die Proteasenaktivität der Niere und des Magens war bei den geschädigten Tieren ebenfalls erhöht.

Bezogen auf g Frischgewicht wurde eine signifikante Verminderung der Enzymaktivität der Leber, der Haut und der Nekrose verglichen mit der Haut bei den verbrannten und den verbrannten und infizierten Versuchstieren festgestellt. Die Proteasenaktivität der Milz und der Niere der geschädigten Tiere war dagegen erhöht (siehe Tab. 11,12 und Abb. 13,14).

Tabelle 11: E / g FG Neutrale Proteasen: Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	Kontrolltiere				Versuchstiere (inf. und nicht inf.)				
	n	x	v	s	n	x	v	s	p
Leber	15	7,194	1,181	1,0867	21	4,393	0,974	0,986	0,0005
Milz	13	5,972	1,656	1,286	16	7,065	6,497	2,548	0,1
Niere	13	3,472	0,314	0,560	16	4,015	2,714	1,647	0,15
Magen	10	3,868	0,436	0,660	21	2,349	0,496	0,704	0,0005
Haut	14	1,734	0,901	0,949	20	1,080	1,336	1,155	0,05
Haut Nekrose	14	1,734	0,901	0,949	21	1,208	0,178	0,421	0,05
Haut verb. Nekrose	20	1,080	1,336	1,155	21	1,208	0,178	0,421	0,45

Abbildung 13: Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)

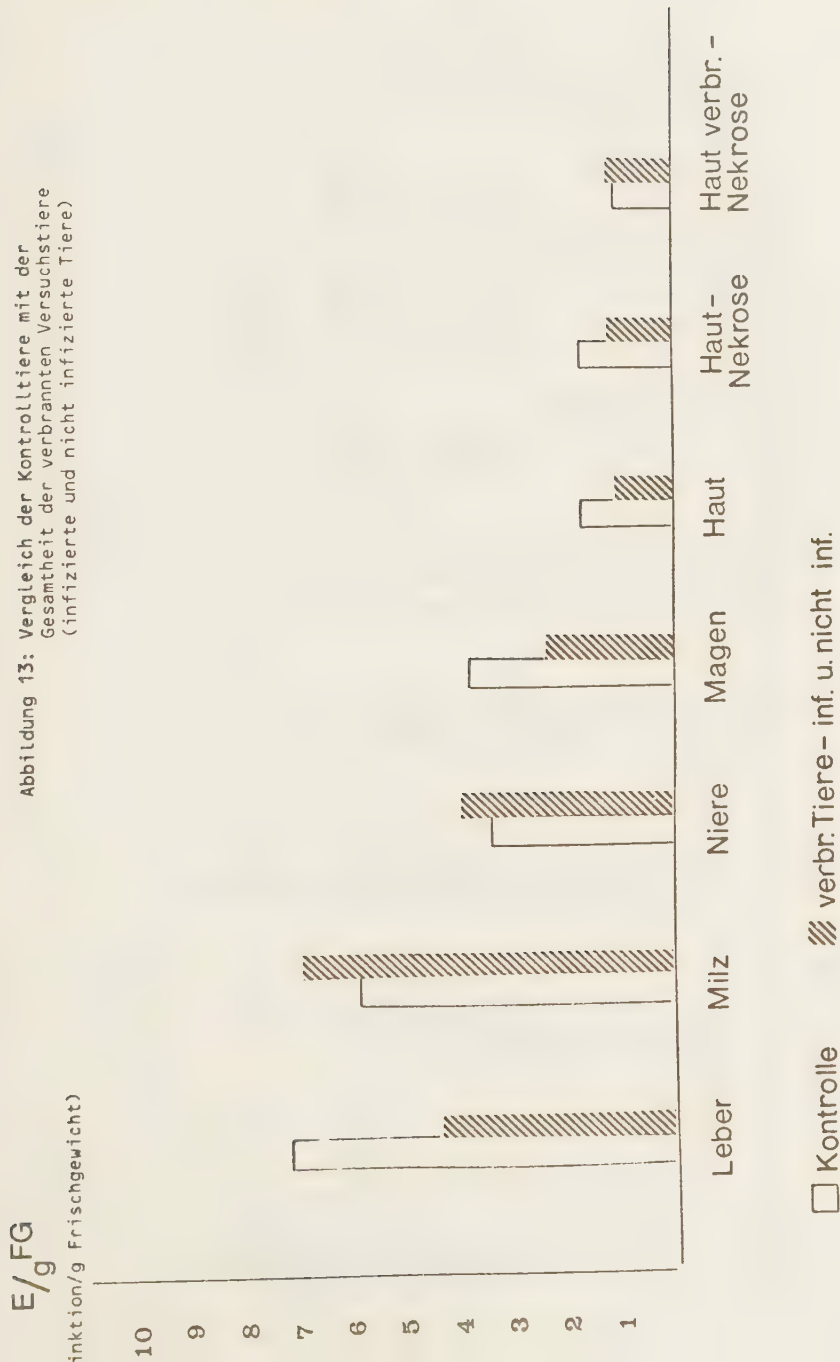


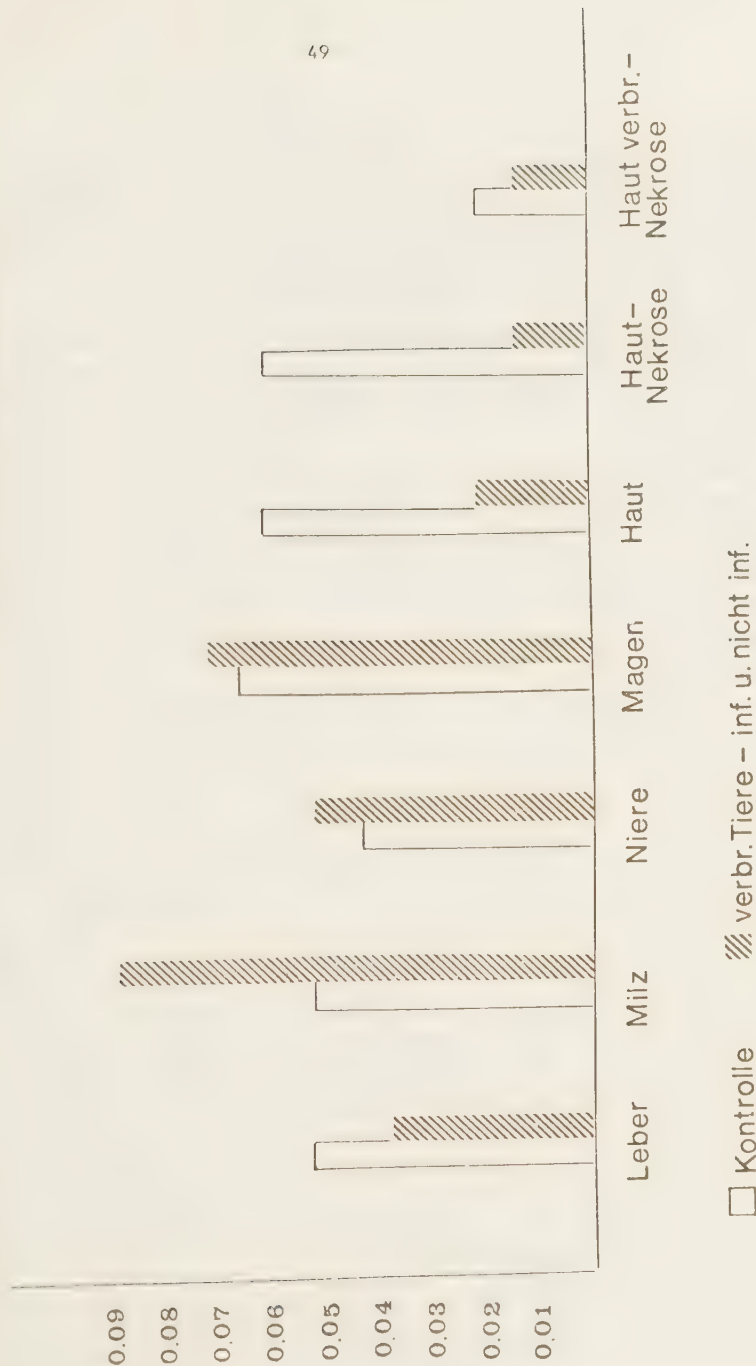
Tabelle 12: E / mg Protein Neutrale Proteasen : Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere			s	n	Versuchstiere (inf. und nicht inf.)			
		x	v				x	v	s	p
Leber	15	0,053	0,000269	0,0164	21		0,038	0,0000748	0,00864	0,0025
Milz	13	0,0522	0,000275	0,0165	16		0,089	0,000848	0,02912	0,0005
Niere	13	0,043	0,000237	0,0153	16		0,052	0,000494	0,0222	0,1
Magen	10	0,066	0,000482	0,0219	21		0,072	0,00256	0,0505	0,35
Haut	14	0,061	0,00221	0,0470	19		0,021	0,000232	0,01523	0,005
Haut Nekrose	14	0,061	0,00221	0,0470	21		0,014	0,0000873	0,00934	0,0025
Haut verb. Nekrose	19	0,021	0,000232	0,0152	21		0,014	0,0000873	0,00934	0,05

E/mg Prot.
(Extinction/mg Protein)

Abbildung 14: Vergleich der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der verbrannten Versuchstiere (infizierte und nicht infizierte Tiere)



Der Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und zusätzlich infizierten Tieren erbrachte bei diesen eine signifikante Aktivitätsverminderung bezogen auf mg Protein in der Leber und in der Nekrose verglichen mit der Haut.

Ebenso war eine Verminderung der Enzymaktivität der geschädigten Tiere im Magen und der Haut, die fern vom Verbrennungsareal entnommen wurde im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen. Die Milz und die Niere der verbrannten und infizierten Versuchstiere zeigte eine Aktivitätserhöhung.

Bezogen auf g Frischgewicht waren bei den geschädigten Versuchstieren signifikante Aktivitätsminderungen der Haut, der Leber und des Magens, sowie der Nekrose, verglichen mit der normalen Haut, festzustellen, während die Milz der verbrannten und infizierten Tiere eine signifikante Enzymaktivitätserhöhung zeigte. Die Niere der geschädigten Tiere zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Proteasenaktivität (siehe Tab. 13,14 und Abb. 15,16).

Tabelle 13:E / g FG Neutrale Proteasen : Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere		s	n	Versuchstiere (inf.)			
		x	v			x	v	s	p
Leber	15	7,194	1,181	1,0867	6	4,323	0,766	0,8752	0,0005
Milz	13	5,972	1,656	1,286	6	6,856	0,628	0,7924	0,05
Niere	13	3,472	0,314	0,560	6	5,100	4,824	3,1963	0,1
Magen	10	3,868	0,436	0,660	6	2,190	0,287	0,5357	0,0005
Haut	14	1,734	0,901	0,949	5	0,908	1,174	1,0835	0,1
Haut Nekrose	14	1,734	0,901	0,949	6	0,760	0,228	0,4770	0,05
Haut verb. Nekrose	5	0,908	1,174	1,0835	6	0,760	0,228	0,4770	0,4

Abbildung 15: Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren

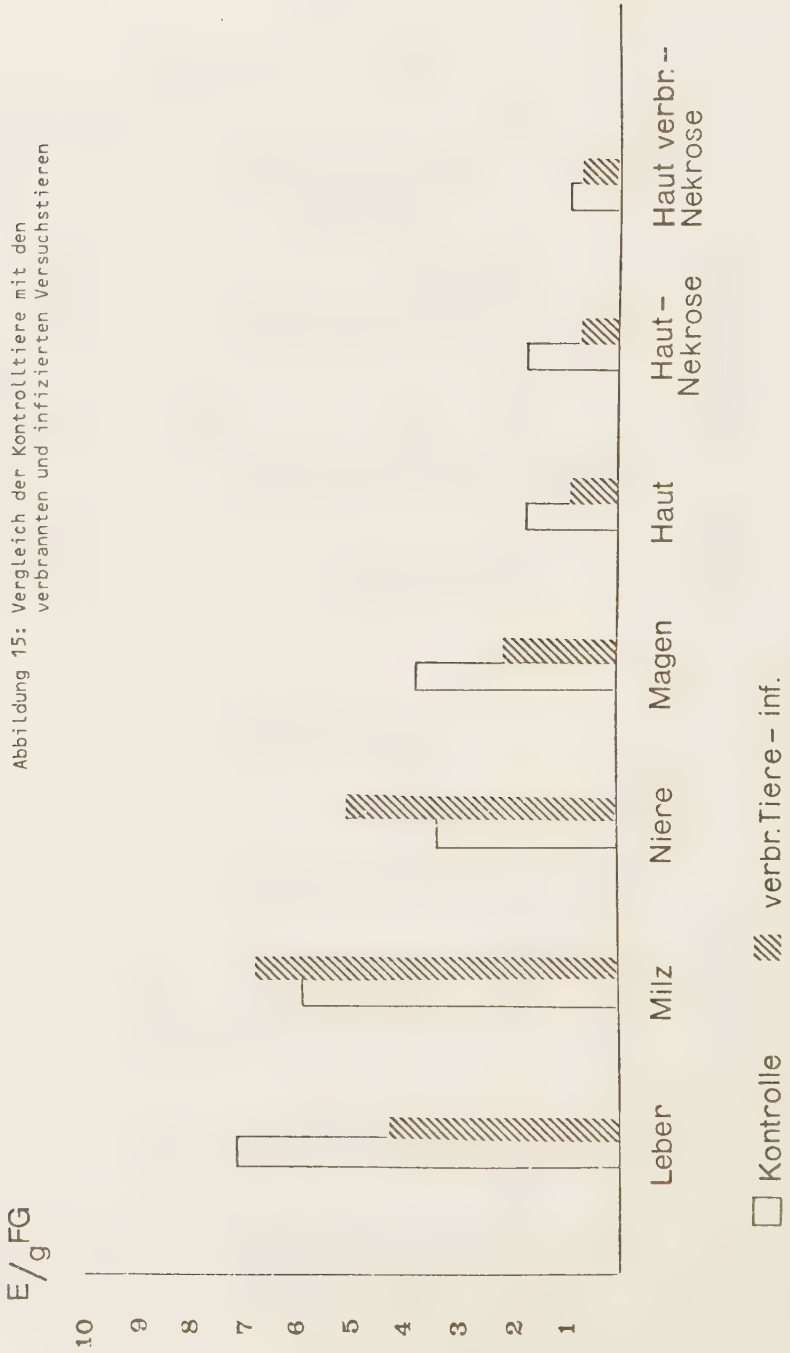


Tabelle 14: E / mg Protein Neutrale Proteasen :Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren

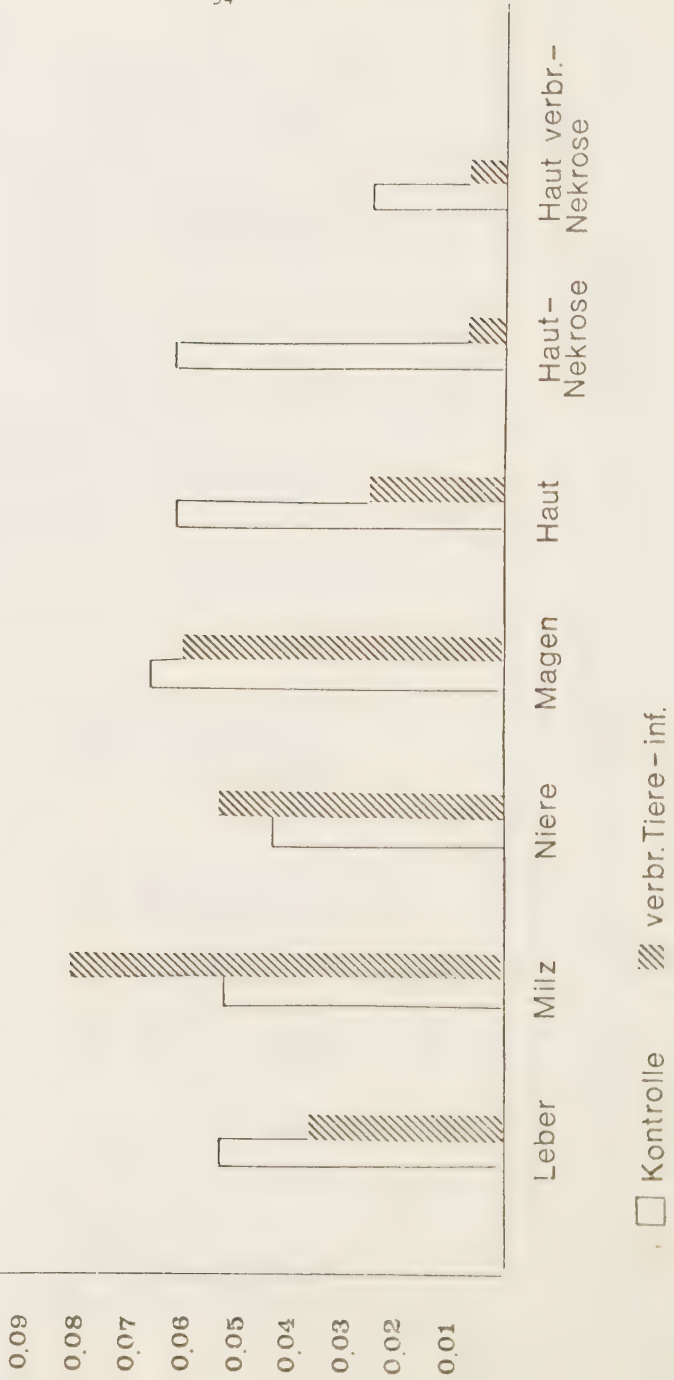
Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere			s	n	Versuchstiere (inf.)				p
		x	v				x	v	s		
Leber	15	0,053	0,000269		0,0164	6	0,036	0,000458	0,00676	0,0025	
Milz	13	0,0522	0,000275		0,0165	6	0,081	0,061	0,2469	0,15	
Niere	13	0,043	0,000237		0,0153	6	0,0536	0,000723	0,0268	0,25	
Magen	10	0,066	0,000482		0,0219	6	0,060	0,000602	0,0245	0,475	
Haut	14	0,061	0,00221		0,0470	5	0,025	0,000719	0,0268	0,45	
Haut Nekrose	14	0,061	0,00221		0,0470	6	0,007	0,0000157	0,00396	0,0005	
Haut verb. Nekrose	5	0,025	0,000719		0,0268	6	0,007	0,0000157	0,00396	0,15	

E/mg Prot.

(Extinktion/mg Protein)

Abbildung 16: Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und infizierten Versuchstieren



Beim Vergleich der Gruppe der verbrannten Tiere mit der Gruppe der verbrannten und infizierten Tiere zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität.

Die Enzymaktivität der verbrannten und infizierten Versuchstiere war pro mg Protein in der Leber, der Milz und dem Magen vermindert, während in der Niere und der Haut eine Aktivitätserhöhung festzustellen war.

Bezogen auf g Frischgewicht konnte man bei den verbrannten und infizierten Tieren eine Verminderung der Proteasenaktivität in der Leber, der Milz, dem Magen und der Haut sehen, während die Niere eine Enzymaktivitätserhöhung zeigte (siehe Tab. 15,16 und Abb. 17,18).

Tabelle 15: E / g FG Neutrale Proteasen: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren
Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere (nicht inf.)			n	x	v	s	Versuchstiere (inf.)		
		x	v	s					v	s	p
Leber	15	4,421	1,115	1,0559	6	4,323	0,766	0,8752	0,4		
Milz	10	7,190	10,433	3,230	6	6,856	0,628	0,7924	0,35		
Niere	10	3,364	0,587	0,766	6	5,100	4,824	2,1963	0,1		
Magen	15	2,413	0,591	0,768	6	2,190	0,287	0,5357	0,25		
Haut	15	1,137	1,464	1,2099	5	0,908	1,174	1,0835	0,35		

Abbildung 17: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren

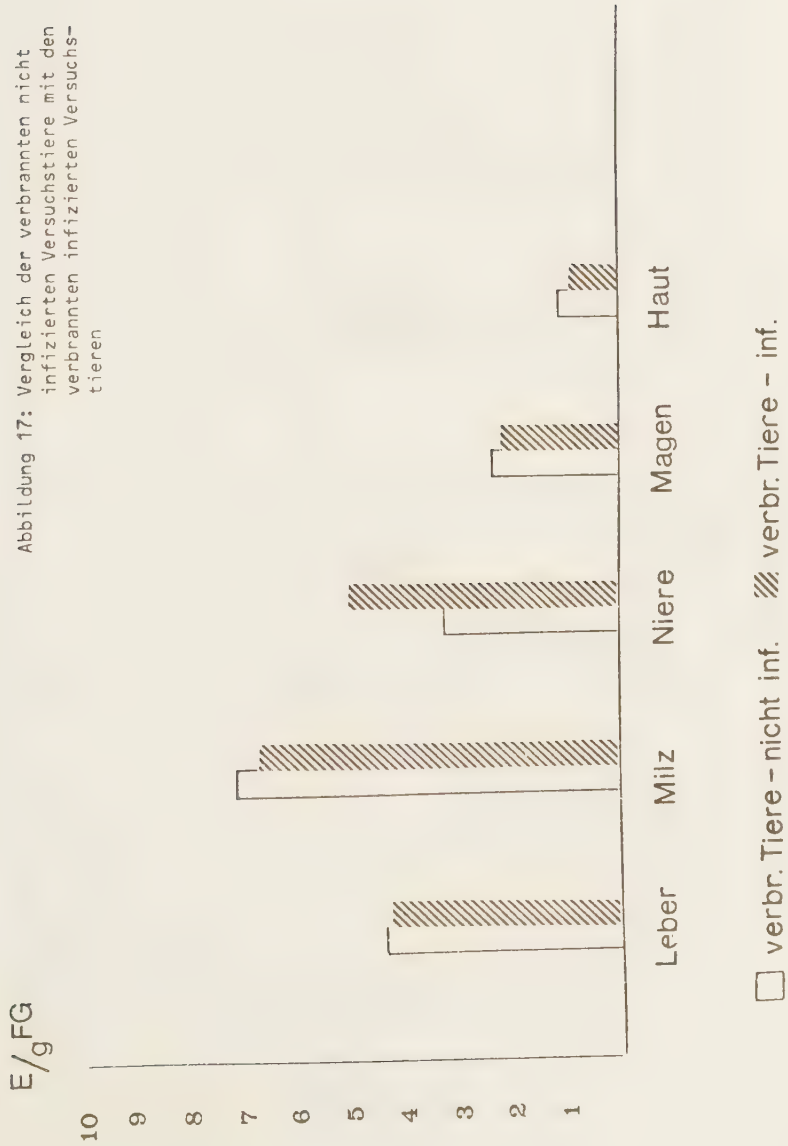


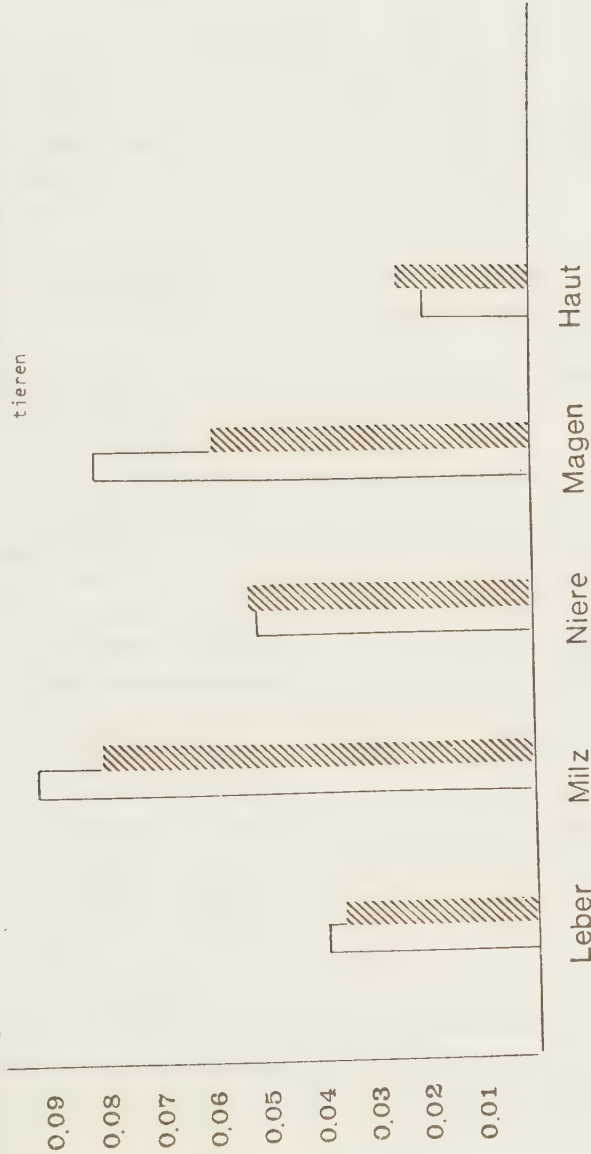
Tabelle 16:E / mg Protein Neutrale Proteasen: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren

Mittelwerte, Varianz, Standardabweichung, Signifikanz

	n	Kontrolltiere (nicht inf.)				Versuchstiere (inf.)			
		x	v	s	n	x	v	s	p
Leber	15	0,039	0,000089	0,00943	6	0,036	0,0000458	0,00676	0,25
Milz	10	0,093	0,00197	0,0443	6	0,081	0,061	0,2469	0,20
Niere	10	0,052	0,000422	0,0254	6	0,0536	0,000723	0,0268	0,475
Magen	15	0,082	0,00305	0,0552	6	0,060	0,000602	0,0245	0,15
Haut	14	0,020	0,0000954	0,00972	5	0,025	0,000719	0,0268	0,35

Abbildung 18: Vergleich der verbrannten nicht infizierten Versuchstiere mit den verbrannten infizierten Versuchstieren

E/mg Prot.
(Extinktion/mg Protein)



□ verbr. Tiere - nicht inf. ▨ verbr. Tiere - inf.

2.5. Diskussion

Die Methode zur Bestimmung saurer Proteasen ist hauptsächlich an die Bestimmung von Kathepsin D adaptiert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß in der beschriebenen Testanordnung z.B. im Magen eine gewisse Pepsinaktivität mit eingeschlossen ist. Bei den neutralen Proteasen gibt es kein Enzym, das eine besondere Substratspezifität für Hämoglobin besitzt, sodaß hier die Gesamtheit der neutralen Proteasenaktivität gemessen wurde. Dabei ist festzustellen, daß die Granulozytenkollagenasen und Elastasen sowohl von α_1 -Antitrypsin als auch von α_2 -Makroglobulin inhibiert bzw. gebunden werden.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, daß, bedingt durch die Verbrennung intrazellulär ein großes proteolytisches Potential vorhanden ist, wahrscheinlich auch extrazellulär. Der extrazelluläre Aktivitätsanstieg ist zu sehen, wenn lokal keine Möglichkeit der Inaktivierung durch Inhibitoren besteht.

Die Pathogenese der Verbrennungskrankheit zeigt Veränderungen an der Struktur und am Stoffwechsel der einzelnen Organe. So beschrieb 1957 Bekhum und Peters eine reduzierte Harnstoffsynthese an Leberschnitten von verbrannten Ratten, Kohler eine Einschränkung der Proteinsynthese und eine Verringerung des ATP/ADP-Quotienten der Rattenleber nach Verbrühung.

Wie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, findet eine allgemeine Zellschädigung des Organismus statt. Die einzelnen Organe lassen jedoch eine unterschiedliche Empfindlichkeit erkennen.

So ist bei der Bestimmung der sauren Proteasen ein Anstieg der Enzymaktivität an der verbrannten Haut, bezogen auf g Frischgewicht von über 100 % zu sehen. Die Niere zeigt bei den geschädigten Tieren, sowohl bezogen auf g Frischgewicht als auch auf mg Protein eine signifikante Aktivitätserhöhung.

Bezogen auf mg Protein wurde der größte Aktivitätsanstieg im Magen gefunden, wobei, wie bereits erwähnt, eine gewisse Pepsinaktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Die Milz zeigt einen Aktivitätszuwachs von 70 %, was vermutlich durch die große Anzahl von Granulozyten bedingt ist.

Als Ausdruck eines generalisierten Katabolismus dürfte die Tatsache zu werten sein, daß ein Aktivitätsanstieg auch weitentfernt der Verbrennungswunde nachzuweisen ist.

Im Vergleich zu den sauren Proteasen ist bei den neutralen Proteasen als herausragendstes Merkmal festzustellen, daß sowohl eindeutige Aktivitätssteigerungen der Milz und der Niere, als auch eindeutige Aktivitätsverminderungen der Leber und der Haut vorhanden sind. Dies trifft insbesondere zu auf den Vergleich der Haut der Kontrolltiere mit der Haut der Versuchstiere, die entfernt der Verbrennungsstelle gewonnen wurde, als auch auf das verbrannte Hautareal. Es scheint hier eine gewisse Inhibition der Enzymaktivität stattzufinden. Bezogen auf mg Protein drückt sich das in einer mehr als 100%-igen Aktivitätsverminderung aus. Die Leber zeigte eine signifikante Enzymaktivitätsverminderung bezogen auf mg Protein und g Frischgewicht.

Die Verbrennung der Haut zeigt bei allen Untersuchungen eine Reaktion des Gesamtorganismus. Die sauren und neutralen Proteasen reagieren in den verschiedenen Organen als Gesamtheit auf das Verbrennungstrauma. Das Organ Haut erfährt jedesmal eine spezifische Veränderung, entweder bei den sauren Proteasen eine Aktivitätssteigerung oder bei den neutralen Proteasen eine Aktivitätsverminderung.

Da diese Veränderungen auch weitentfernt der Verbrennungswunde nachzuweisen sind, ist dies für die Verwendung von Spalthauttransplantaten als Therapie von Bedeutung. Hier muß mit einem veränderten Enzymmuster in der sogenannten gesunden Haut gerechnet werden.

3. Zusammenfassung

Einleitend wurde die Geschichte der Proteasenforschung, die Entwicklung und Vereinheitlichung der Nomenklatur, sowie eine kurze Darstellung der Pathohistologie der Haut und der Pathogenese der Verbrennungskrankheit dargestellt.

Es wurde eine Methode zur Bestimmung neutraler Proteasen entwickelt, die auf der Bestimmung proteolytischer Wirkung auf das Proteasensubstrat nach Anson basiert. Dazu wurden Kurven erarbeitet, die die Abhängigkeit der Enzymkonzentration, der Enzymaktivität und der Zeit aufzeigen. Ferner wurden Eichkurven für die untersuchten Organe: Leber, Milz, Niere, Magen und Haut aufgestellt.

Im experimentellen Teil wurden die Veränderungen der Enzymaktivität der sauren und neutralen Proteasen im Spätstadium der Verbrennungskrankheit ermittelt. Die Versuchstiere wiesen dritt-gradige Verbrennungen, die 15 % der Körperoberfläche betrug, auf. Die Verbrennungen wurden durch Kontamination mit 90° Celsius heißem Wasser für die Dauer von 15 Sekunden hervorgerufen.

Im einzelnen wurden folgende Befunde erhoben:

Saure Proteasen:

1. Beim Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren war die Enzymaktivität der Versuchstiere, bezogen auf g Frischgewicht, in der Leber, der Niere, der Haut und der Nekrose, verglichen mit der Haut deutlich erhöht. Signifikante Aktivitätserhöhungen zeigten die Niere und die Haut. Beim Vergleich der Haut der Kontrolltiere zu der "intakten" Haut der Versuchstiere war ebenfalls eine signifikante Enzymaktivitätserhöhung zu erkennen.

Bezogen auf mg Protein zeigten sich signifikante Proteasenaktivitätserhöhungen der Versuchstiere in der Leber, der Milz, der Niere und dem Magen.

2. Der Vergleich der Enzymaktivitäten der Kontrollgruppe mit der Gesamtheit der verbrannten Tiere, also verbrannte und verbrannt infizierte Tiere,

zeigte, bezogen auf mg Protein signifikante Aktivitätserhöhungen der Milz, der Niere und des Magens.

Bezogen auf g Frischgewicht war eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität der geschädigten Tiere in der Niere und der Nekrose im Vergleich zur Haut festzustellen.

3. Der Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannt infizierten Tieren erbrachte eine signifikante Aktivitätserhöhung bezogen auf mg Protein in der Milz und im Magen bei den geschädigten Tieren .

Bezogen auf g Frischgewicht war eine signifikante Enzymaktivitätserhöhung der verbrannt infizierten Tiere in der Niere und der Nekrose gegenüber der Haut zu sehen.

4. Beim Vergleich der Gruppe der verbrannten Tiere mit der Gruppe der verbrannt infizierten Tiere zeigten sich, bezogen auf mg Protein, signifikante Aktivitätsverminderungen der Leber, der Niere und des Magens bei den infizierten Versuchstieren.

Bezogen auf g Frischgewicht konnte man bei den infizierten Tieren eine signifikante Aktivitätsverminderung in der Haut feststellen.

Neutrale Proteasen:

1. Beim Vergleich der Kontrolltiere mit den nicht infizierten Versuchstieren zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten der Enzymaktivitäten. Bezogen auf mg Protein ist eine signifikante Aktivitätsverminderung der verbrannten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Leber, der Haut und in der Nekrose festzustellen, während in der Milz der Versuchstiere eine signifikante Aktivitätserhöhung zu sehen ist.

Bezogen auf g Frischgewicht bestätigt sich die signifikante Enzymaktivitätsverminderung der geschädigten Tiere in der Leber, während im Magen eine signifikante Aktivitätserhöhung erkennbar ist.

2. Der Vergleich der Enzymaktivitäten der Kontrolltiere mit der Gesamtheit der Versuchstiere, also verbrannte und verbrannt infizierte Tiere, zeigte bei den geschädigten Tieren, bezogen auf mg Protein eine signifikante Aktivitätsverminderung der Leber, der Haut, der Nekrose verglichen mit der Haut und der Nekrose verglichen mit der verbrannten Haut.

Die Milz der geschädigten Tiere zeigte eine signifikante Enzymaktivitäts-erhöhung.

Bezogen auf g Frischgewicht wurde eine signifikante Verminderung der Enzymaktivität in der Leber, der Haut und der Nekrose verglichen mit der Haut bei den Versuchstieren festgestellt.

3. Der Vergleich der Kontrolltiere mit den verbrannten und zusätzlich infizierten Tieren erbrachte bei diesen eine signifikante Aktivitätsverminderung bezogen auf mg Protein in der Leber und in der Nekrose verglichen mit der Haut.

Bezogen auf g Frischgewicht waren bei den geschädigten Tieren signifikante Aktivitätsverminderungen der Haut, der Leber und des Magens, sowie der Nekrose, verglichen mit der normalen Haut, festzustellen, während die Milz der Versuchstiere eine signifikante Enzymaktivitätssteigerung zeigte.

4. Beim Vergleich der Gruppe der verbrannten Tiere mit der Gruppe der verbrannten und infizierten Tiere waren keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität festzustellen.

Grundsätzlich liegt bei Verbrennungsfällen der Haut, die 15 % der Körperoberfläche betragen, eine Gesamtschädigung des Organismus vor, die auch Veränderungen der proteolytischen Aktivität der einzelnen Organe einschließt.

4. Literaturverzeichnis

1. Anson M. L., J. gen. physiol. 22, 79, (1939)
2. Barret A. J., Biochem. j. 104, 601 (1967)
3. Barret A. J., in Reiche et al., ed Proteases and biological Control Cold Spring Harbor Laboratory 1975
4. Barret A. J., ed. Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, Elsevier, North Holland Biomedical Press (1977)
Introduction to the history and classification of tissue proteinases, Thieme Verlag, Stuttgart 1-55, 135-140
5. Baumeister R. G., Bohmert H., Weber G. A., Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 13, 185 (1979)
6. Büchner Th., G. Junge - Hülasing, Wagner H., Oberwittler W., Hauss W. H., Klin. Wochenschrift 48, 867, 872 (1970)
7. Cochrane C. G., Aiken B. S., J. Exp. Med. 137, 733 (1966)
8. Czaja A. J., et al, Arch. Surg. 110 (5), 600, (1975)
9. Dean R. T., Nature 257, 414, (1975)
10. Dingle J. T., Poole A. R., Lazarus G.S., Barret A.J., J. Exp. Med. 137, 1124 (1973)
11. Gordon J., Hall R. A., Heggie R. M., Horne E. A., J.Path. Bact. 58, 51 (1946)
12. Hernandez - Richter H., Struck H., Die Wundheilung, Thieme Verlag Stuttgart (1970)
13. Huismann W., Lanting L., Doddema H.J., Bouma J. M. W., Gruber M., Biochem. Biophys. Acta 370, 297 (1974)
14. Janoff A., et al, Proteases and Biological Control 1975 by Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation 603 - 620
15. Karlson P., Biochemie, 8. Auflage 1972, Thieme Verlag Stuttgart 1972, 135 - 140
16. Koslowski L., Krause F., Klinische Pathophysiologie, Hrsg. Siegenthaler, Thieme Verlag Stuttgart 1973

17. Lazarus G. S. , J.Invest Dermatol 62, 367 - 71 (1974)
18. Levenson S. M. , Am Surg 180 (4) 670 704 (1974)
19. Levine Ns. et al, Plast. Reconstr. Surg. 56 (4) 423 (1975)
20. Lindner J., Melsunger Med. Mittlg. 47, 117 - 157 (1973)
21. Mariani U. , Plast. Reconstr. Surg., 57 (2), 191 (1976)
22. Moritz A. R. , Amer. J. Path. 23, 915 (1947)
23. Neely WA. et al, Am. Surg. 179, 291 (1974)
24. Ohlsson K. , Proteases and Biological Control 1975 by Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation 603 - 620
25. Olivari N. , Plast. und wiederherstell. Chirurgie Stuttgart, Schattauer (1975)
26. Poole A. R. , Hembry R. M. , Dingle J. T. , Calif. Tissue Res. 12 313 (1973)
27. Ramirez A. T., Tamondong C. T., Del Castillo A. N. L. , Dino B. R., Surgery 68, 813 (1970)
28. Sharbaugh R. J. , et al, Arch. Surg. 110 (9) , 1146 (1975)
29. Schölmerich J. , Mastari H. , Hermawan S. , Richter I. E. , Wehrmedizinische Monatszeitschrift, Bernhard und Graefe Verlag München, 6 169 - 177 (1977)
30. Schönenberger G. A. et al, Chirurg 45, 20 - 28 (1974)
31. Schönenberger G. A. , Städtler K. , Allgöwer M. , Burkhart F. , Müller W. , Zellner P. , Chirurg 45 , 20 (1974)
32. Thorne K. J. , Oliver R. C. , Barrett A. J. , Infect. Immun. 14, 555 (1976)
33. Vakilzadeh F. , Spez. patholog. Anatomie Band 7, Hrsg. Doerr - Seifert - Nehlinger Springer Berlin, Heidelberg, New York 1973
34. Versar F. , Willenegger H. , Schweiz. med. Wschr. 91 1234 (1961)
35. Walther D. , Plastische Wiederherstellungschirurgie Hrsg. Stuttgart, Schattauer 1975, 173 - 81

36. Walther D. , Verh. dtsch. Ges. Path. 47 211 - 217 (1963)
37. Walther D. , Beitr. path. Anat. 120 3, 355 - 370 (1959)
38. Warden G. D. , et al, Am. Surg. 181 (3) 363 (1975)
39. Wegener K. , Köhler G. , Wesch H. , Bock R. , Unfallheilkunde 83, 562 - 570 (1980) Springer Verlag
40. Weichselbaum T. E. , Amer. Clin. Path. Techn. Bull 10, 40 (1946)
41. Wenk R. , Lyophilisierte Schweinehaut als xenogene Interimsdeckung bei Ratten nach Verbrennungen III. Grades, Med. Dissertation, München 1981
42. Weston P. D. , Poole A. R. , Lysosomes in Biology and Pathology (Dingle J. ed.), North Holland Publishing Co. Amsterdam 425 (1973)
43. Zimmermann W. E. , Dietrich D. , Oehlert W. , Langenbeck's Arch. Klin. Chir. 329, 1041 - 42 (1971)

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bohmert danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Priv. Doz. Dr. Baumeister und Herrn Prof. Dr. Fritz gilt für die stete und uneingeschränkte Unterstützung und Hilfestellung mein besonderer Dank.

Lebenslauf

Geboren am : 30. September 1947
in : Augsburg

Volksschule : September 1953 - 1961 Augsburg

Gymnasium : September 1961 - 1969 Eichstätt

Reifeprüfung : 1969 Gabrieli - Gymnasium Eichstätt

Praktikum zum Studium : Oktober 1969 - Juni 1971 Apotheke am Königs-
der Pharmazie platz Augsburg

Pharmazeutische Vor- : Juni 1971
prüfung

Pharmazeutisch-techn. : bis Oktober 1971 Hubertus Apotheke Aichach
Assistent

Medizinstudium : Sommersemester 1972 - Sommersemester 1978
Ludwig - Maximilian - Universität München

Ärztliche Prüfung : 25. Oktober 1978

Approbation : 30. Oktober 1978

Chir. Assistenzarzt : seit 1. Dezember 1978
I. Chir. Klinik Augsburg Prof. Dr. H. Gumrich

